SNI 01-2897-1992

Standar Nasional Indonesia

Cara uji cemaran mikroba

ICS 67.040

Badan Standardisasi Nasional

Daftar Isi

Halaman

Daftar isi i

A. Persiapan dan Homogenisasi Contoh ....
1. Definisi .... 1 dari 54
2. Dasar Persiapan .... 1 dari 54
3. Peralatan .... 1 dari 54
4. Larutan pengencer .... 1 dari 54
5. Persiapan contoh .... 2 dari 54
6. Homogenisasi contoh .... 2 dari 54
7. Homogenisasi contoh makanan untuk uji Salmonella .... 4 dari 54
7 dari 54

B. Cara Pemeriksaan Mikroba ....
1. Angka Lempeng Total .... 7 dari 54
2. Bakteri Coliform .... 10 dari 54
3. Escherichia Coli .... 15 dari 54
4. Salmonella .... 18 dari 54
5. StaphylococcusAureus .... 22 dari 54
6. Eneterococci .... 24 dari 54
7. Clostridium Perfringens .... 25 dari 54
8. Vibrio Cholerae .... 27 dari 54
9. Kapang clan Khamir .... 32 dari 54

C. Pengencer, Perbenihan (media) dan pereaksi .... 33 dari 54
1. Pengencer .... 33 dari 54
2. Perbenihan .... 34 dari 54
3. Pereaksi .... 50 dari 54

Pustaka .... 54 dari 54

Pendahuluan

Standar Industri Indonesia untuk Cara Uji Makanan/Minuman, Bahan Tambahan Makanan, Cemaran Logam dan Cemaran Mikroba disusun berdasarkan hasil rapat TTSI Makanan/ Minuman.

Penyusunan SII Cara Uji ini dimaksudkan untuk lebih menyederhanakan dan penghematan disegala bidang, mengingat ada 51 buah SII Makanan/Minuman yang direvisi disusun pada saat yang sama.

Konsep SII Cara Uji ini disusun berdasarkan :
1. A.O.A.C, Official Methode of Analysis (1984)
2. Pearson's Chemical Analysis of Foods (1981)
3. Cara Uji Standar Industri Indonesia untuk komoditi yang bersangkutan.
4. Laporan Sidang Pleno IX Panitia Kodek Makanan Indonesia, Dep. Kesehatan, 1983.
5. I.C.M.S.F (International Commission Microbiological Spesification for Foods) of The International of Methods for The Microbiological Cosieties,1980.
6. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food, 1976. 7. Standard Methods for Examination of Waterneed Wastewater 14th ed, 1975 APHA-ANWA-SPCF.
8. Hasil-hasil penelitian pengujian.

A. Persiapan dan Homogenisasi Contoh

1. Definisi

Homogenisasi adalah cara persiapan contoh makanan untuk memperoleh distribusi bakteri sebaik mungkin di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

2. Dasar persiapan

Membebaskan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan clan untuk menggiatkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang

kurang menguntungkan di dalam makanan. 3.
Peralatan

3.1 Mesin cincang yang sesuai.

3.2 Alat homogenisasi (blender, stomacher, dll) dengan kecepatan putaran antara 8000 - 45000 putaran per menit.

3.3 Wadah pencampur (blenderjar) dari gelas atau logam yang tahan suhu autoklaf (121°C selama 60 menit).

3.4 Timbangan dengan kapasitas 2000 g dengan tingkat kepekaan 0,1 g. 3.5 Pisau, garpu, sendok, gunting, spatula, alat pembuka kaleng steril, dsb. 3.6 Pipet ukur 1 ml clan 10 ml steril.

3.7 Tabung reaksi (22 x 220 mm).

3.8 Gelas piala, labu Erlenmeyer, botol pengencer steril. 4. Larutan pengencer

- Buffered Distilled Water (BDW), -Buffered Peptone Water (BPW), - Phosphat Buffered Distilled Water (PBDW), - Peptone Water(PW).

5. Persiapan contoh

5.1 Penganan wadah/kemasan

Disiapkan alat-alat untuk penyiapan contoh yang sudah steril atau dapat disterilkan menggunakan api bunsen setelah lebih dahulu dibersihkan dengan alkohol 70%. Cara terakhir dilakukan sesaat sebelum pengujian berlangsung.

5.1.1 Wadah kertas atau plastik :

Pada bagian yang akan dibuka dibersihkan dengan alkohol 70%, kemudian dibuka secara aseptik.

5.1.2 Wadah botol :

Sumbat atau tutup botol dibersihkan dengan alkohol 70%, lalu dipanaskan di api bunsen sebentar. Sumbat dibuka secara aseptik.

5.1.3 Wadah kaleng :

Permukaan kaleng dicuci bersih clan terakhir dibersihkan dengan alkohol 70%. Bagian ini dilewatkan di api, lalu dibuka secara aseptik.

6. Homogenisasi contoh 6.1

Makanan bentuk cairan

Dipipet sejumlah 25 ml cuplikan (contoh) ke dalam Erlenmeyer atau wadah lain yang sesuai yang telah berisi 225 ml larutan pengencer (1 : 10). Dikocok beberapa kali hingga homogen. Contoh air di dalam botol lebih dahulu dikocok 25 kali, lalu cuplikan segera diambil dengan pipet yang sesuai.

6.2 Makanan bentuk serbuk

Ditimbang sejumlah 25 g cuplikan ke dalam Erlenmeyer atau wadah lain yang sesuai, yang telah berisi 225 ml larutan pengencer (1:10). Buat pengenceran selanjutnya dari 10^{-1} hingga diperoleh pengenceran yang diperlukan (seperti yang tertera pada Gambar). Untuk contoh susu bubuk yang tidak mudah larut dicampur lebih dahulu dengan larutan 1,25% natrium sitrat. Untuk pengenceran awal suhu larutan pengencer disesuaikan hingga 45°C; 225 ml larutan pengencer ini ditambahkan kepada 25 g cuplikan.

6.3 Makanan bentuk kental

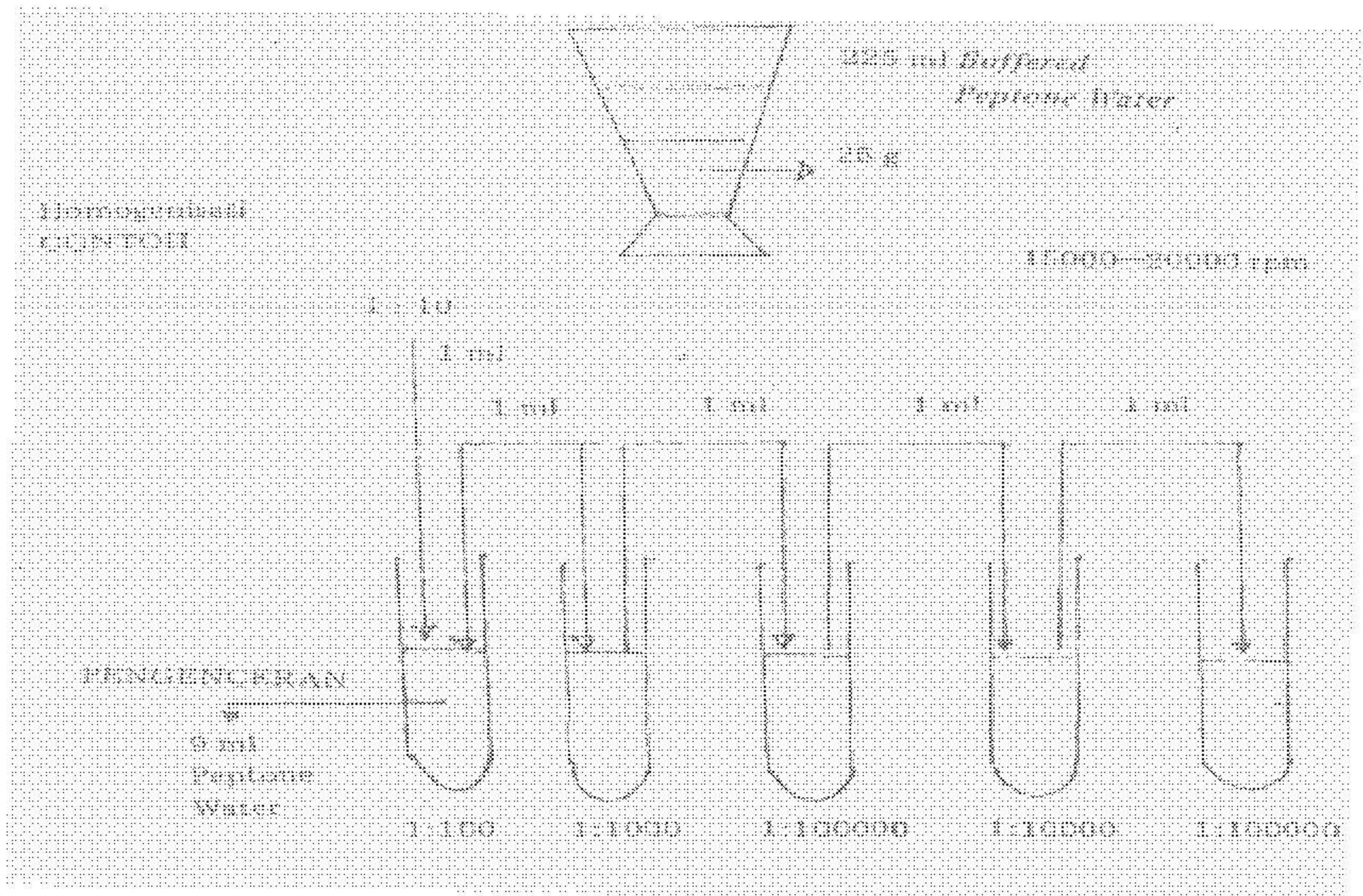
Dipipet sejumlah 25 ml atau ditimbang sejumlah 25 g cuplikan ke dalam Erlenmeyer atau wadah lain yang sesuai yang telah berisi 225 ml larutan pengencer hingga diperoleh pengenceran

1: 10. Dikocok dengan baik kemudian dilanjutkan dengan pengenceran yang diperlukan (seperti yang tertera pada Gambar). Untuk contoh susu kental , susu evaporasi atau susu yang dipekatkan yang menggumpal, digunakan pengencer *Phosphate Buffered Water*yang sudah mengandung 1,25% natrium sitrat sebagai larutan pengencer pertama.

6.4 Makanan bentuk padat

Ditimbang sejumlah 25 g cuplikan ke dalam wadah blender. ditambahkan 225 ml larutan pengencer hingga diperoleh pengenceran 1: 10. Dihomogenkan, kemudian dilanjutkan dengan pengenceran yang diperlukan (seperti yang tertera pada Gambar). Untuk contoh keju; sebanyak 25 g cuplikan dipindahkan secara aseptik ke dalam wadah blender steril yang telah dipanaskan pada suhu 40-45°C clan kemudian ditambahkan 225 ml natrium sitrat hangat. Dicampur selama 2 menit sehingga terbentuk emulsi lalu dibuat pengenceran berikutnya. Untuk contoh mentega larutan pengencer clan pipet dipanaskan hingga 40°C. Contoh dipanaskan di dalam penangas air 40°C selama tidak lebih dari 15 menit hingga cukup cair untuk dipipet. Dengan pipet panas diambil 25 ml cuplikan ke dalam 225 ml larutan pengencer (40°C) lalu dikocok hingga homogen. Dilanjutkan dengan pengenceran yang diperlukan (seperti yang tertera pada Gambar).

6.5 Makanan beku

Makanan beku harus lebih dahulu dipecahkan menjadi bagian-bagian kecil dengan menggunakan peralatan tumpul. Bila makanan dibekukan menjadi bentuk blok besar, misalnya ikan clan daging, cuplikan dapat diambil dengan bantuan gergaji, pisau atau bor. Cara lain; produk beku dapat disimpan dalam lemari es (5°C) selama tidak lebih dari 12 jam, untuk memudahkan pengambilan cuplikan. Ditimbang sejumlan 25 g cuplikan berisi 225 ml larutan pengencer ke dalam wadah blender clan ditambahkan 225 ml larutan pengencer. Dihomogenkan kemudian dilanjutkan dengan pengenceran yang diperlukan (seperti yang tertera pada Gambar) Untuk contoh es krim, ditimbang sejumlah 25 g cuplikan clan langsung ditambahkan kedalam 225 ml larutan pengencer. Bila contoh tidak terlalu beku, dapat dibiarkan dulu pada suhu kamar selama tidak kurang dari 15 menit. Setelah meleleh, diaduk hati-hati kemudian cuplikan diambil secara aseptik. Diaduk homogen kemudian dilanjutkan dengan pengenceran yang diperlukan (seperti yang tertera pada Gambar).

Gambar 1
Homogenisasi dan Pengenceran Contoh

7. Homogenisasi contoh makanan untuk uji salmonella

Ditimbang 25 g cuplikan ke dalam wadah blender, ditambahkan 225 ml *Lactose Broth,* dihomogenkan. Tahapan ini merupakan tahap pra-pengkayaan. Untuk jenis contoh tertentu digunakan media pra-pengkayaan yang berbeda (lihatTabel 1).

Tabel 1
Homogenisasi contoh makanan untuk uji salmonella

Contoh makanan	Berat Cuplikan	Media Pra-Pengkaya	Media Pengkaya a)
Serbuk siap pakai (untuk pembuatan biskuit, donat, kue dan roti); tepung makanan bayi, kelapa b)	25 g	225 ml *lactose Broth*	50 ml *Selenite Cystine* (SC) 50 ml Tertratio-nat dengan *Bril-liant Green* (TT) c)
Serbuk ragi	50 g	200 ml air suling steril	50 ml SC 50 ml TT
Krim dan adonan gula untuk kue *topping and frosting*)	25 g	225 ml *Nutri-ent Broth*	05 ml SC 50 ml TT
Susu Bubuk	100 g	Larutan 2 ml *Brilliant Green* 1% dalam 1 liter air Suling d)	50 ml SC 50 ml TT
Makanan mengandung telur (misal mei)	25 g	225 ml *Lactose Broth*	50 ml SC 50 ml TT
Daging mentah, jeroan dan ikan mentah	25 g		225 ml SC 225 ml TT dengan *Brilliant Green* c)
Daging, jeroan, ikan yang telah dipanas-kan, diolah atau dikeringkan	25 g	225 ml *Lactose Broth*. Bila produk mengadung lemak, ditambah 2,2 ml tergi-tol 7.	50 ml SC 50 ml TT

Keterangan :
a) Terhadap masing-masing media pengkaya ditambahkan 5 ml biakan dari tahap pra-pengkayaan. b) Ditambahkan 2,2 ml Tergitol 7 ke dalam *Lactose Btroth.*
c) Terhadap 1000 ml media basah Tetrationat ditambahkan 10 ml *Brilliant Green 1%* dan lodin. d) Dua ml *Brilliant Green 1%* dapat diganti dengan 4 ml kristal violet 1%.

B. Cara pemeriksaan mikroba

1. Angka Lempeng Total

1.1 Metoda *Plate Count* (Angka lempeng)

1.1.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam perbenihan yang cocok selama 24 - 48 jam pada suhu 35 ± 1°C.

1.1.2 Peralatan

Cawan petri dari gelas/plastik (90 - 100 mm)
Pipet ukur (1,5 dan 10 ml) Penangas air 45 ± 1
°C Lemari pengeram 36 ± 1^{0}C Alat penghitung
koloni *(colony counter)*

1.1.3 Perbenihan dan pengencer

- *Buffered Peptone Water (BPM -*
Plate Count Agar (PCA)

1.1.4 Cara kerja

Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai dengan A.6.
Pipet 1 ml dari masing-masing pengenceran (GambarA) ke dalam cawan petri steril secara simplo dan duplo.
Ke dalam setiap cawan petri dituangkan sebanyak 12 - 15 ml media PCA yang telah dicairkan yang bersuhu 45 ± 1°C dalam waktu 15 menit dari pengenceran pertama. Goyangkan cawan petri dengan hati-hati (putardan goyangkan ke depan dan ke belakang serta ke kanan dan ke kiri) hingga contoh tercampur rata dengan perbenihan.
Kerjakan pemeriksaan blangko dengan mencampur air pengencer dengan perbenihan untuk setiap contoh yang diperiksa.
Biarkan hingga campuran dalam cawan petri membeku.
Masukkan semua cawan petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengeram (inkubator) dan inkubasikan pada suhu 35 ± 1°C selama 24 - 48 jam.
Catat pertumbuhan koloni pada setiap cawan yang mengandung 25 - 250 koloni setelah 48 jam.
Hitung angka lempeng total dalam 1 gram atau 1 ml contoh dengan mengalikan jumlah rata-rata koloni pada cawan dengan faktor pengenceran yang digunakan (sesuai).

1.1.4.1 Cara menghitung dan menyatakan hasil

Pilih cawan petri (simplo dan duplo) dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25- 250 setiap cawan. Hitung semua koloni dalam cawan petri dengan menggunakan alat penghitung koloni *(colony counter).* Hitung rata-ratajumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per mililiter atau gram. Jika salah satu dari dua cawan petri terdapatjumlah koloni lebih kecil dari 25 atau lebih besar dari 250, hitung rata-ratajumlah koloni, kalikan dengan faktor pengenceran dan nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri permililiter atau gram. Jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25-250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran seperti yang disebut pada butir a dan b di atas, dan hitung rata-rata jumlah koloni dari kedua pengenceran tersebut. Jika jumlah yang tertinggi lebih besar dari dua kali jumlah yang terkecil, nyatakan jumlah yang lebih kecil sebagai jumlah bakteri per mililiter atau gram.

Jika rata-ratajumlah koloni masing-masing cawan petri tidak terletak antara 25 dan 250 koloni, hitung jumlah koloni seperti pada butir a dan b di atas, dan nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan per mililiter atau gram.

Jikajumlah koloni dari semua pengenceran lebih dari 250 koloni, maka setiap dua cawan petri dengan pengenceran tertinggi dibagi ke dalam 2,4 atau 8 sektor. Hitung jumlah koloni dalam satu bagian atau lebih. Untuk mendapatkan jumlah koloni dalam satu cawan petri, hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pembagi dan pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri perkiraan per mililiter atau gram.

Jika dalam 1/8 bagian cawan petri terdapat lebih dari 200 koloni, maka jumlah koloni yang didapat = 8 x 200 (1600), dikalikan dengan faktor pengenceran dan nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri perkiraan per mililiter atau gram lebih besar dari jumlah yang didapat (lebih besar dari 1600 x faktor pengenceran). Jika tidak ada koloni yang tumbuh dalam cawan petri, nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari satu dikalikan dengan pengenceran yang terendah (<10).

Menghitung koloni perambat *(Spreader).*

Ada 3 macam perambatan pada koloni, yaitu :

(1) merupakan rantai yang tidak terpisah-pisah.

(2) perambatan yang terjadi diantara dasar cawan petri dan perbenihan. (3) perambatan yang terjadi pada pinggir atau permukaan perbenihan.

Kalau terjadi hanya 1 (satu) perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap 1 (satu). Tetapi bila 1 atau lebih rantai terbentuk dan yang berasal dari sumber yang berpisahpisah, maka tiap sumber dihitung sebagai 1 (satu) koloni. Bila (2) dan (3) terjadi maka sebaiknya pemeriksaan diulangi koloni dalam keadaan semacam ini agak sukar dihitung.

1.1.4.2 Cara menghitung dan membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka yang pertama dan kedua dimulai dari kiri), sedangkan angka yang

ketiga diganti dengan 0 apabila kurang dari 5 clan apabila 5 atau lebih dijadikan 1 yang ditambahkan pada angka yang kedua.

Contoh : 523.000 dilaporkan sebagai 520.000 ($5,2 \times 10^5$) 83.000 dilaporkan sebagai 84.000 ($8,4 \times 10^4$).

1.2 Metode penyaringan *(Membrane filter)*

Untuk contoh yang kandungan bakterinya rendah (seperti minuman ringan clan air minum dalam kemasan atau air yang telah diproses).

1.2.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob pada penyaring membran setelah diinkubasikan pada suhu 36 ± 1°C selama 48 jam dalam perbenihan yang cocok.

1.2.2 Peralatan

Pipet ukur 10 ml atau gelas ukur 100 ml.
Cawan petri ~ 50 - 60 mm.
Penyaring membran 0,45 mm.
Pinset
Unit alat penyaringan (filtration unit)
Lemari pengeram 36 ± 1^0C.

1.2.3 Perbenihan *Plate*

Count Agar (PCA).

1.2.4 Cara kerja

Pasang peralatan penyaring membran yang terdiri dari corong, membran penyaring clan penampung yang telah disterilkan lebih dahulu, clan hubungkan dengan vakum sistem.
Masukkan 100 ml cuplikan (contoh) atau sejumlah yang diperlukan ke dalam corong dari alat penyaring dengan menggunakan pipet atau gelas ukur steril. Pergunakan vakum untuk menyaring cuplikan melalui membran clan saring cuplikan seluruhnya.
Bilas seluruh permukaan dalam corong penyaring dengan air pengencer atau air suling steril yang jumlahnya sama dengan jumlah cuplikan yang disaring clan saring cairan pembilas.
Sesudah pembilasan selesai, hentikan vakum.
Buka kembali peralatan penyaring clan dengan pinset yang steril angkat membran penyaring dari alat penyaring.
Letakkan membran penyaring di atas perbenihan *Plate Count Agar* dalam cawan petri (usahakan jangan ada gelembung udara di bawah membran). Inkubasikan cawan dengan posisi terbalik pada 36 ± 1°C selama 48 jam. Hitung jumlah koloni yang terbentuk pada membran yang menyatakan jumlah angka lempeng (angka lempeng total) dalam 100 ml contoh.

2. Bakteri coliform

2.1 Metoda APM (Angka Paling Mungkin) menggunakan 3 tabung 2.1.1

Prinsip

Pertumbuhan bakteri coliform yang ditandai dengan terbentuknya gas dalam tabung Durham, setelah contoh diinkubasikan dalam perbenihan yang cocok pada suhu 36 ± 1°C selama 24 - 48 jam dan selanjutnya dirujuk kepada tabel APM.

2.1.2 Peralatan

a. Tabung reaksi (18 x 180 mm) b. Tabung Durham (10 x 75 mm) c. Pipet ukur 1 ml
d. Inkubator (lemari pengeram) 36 ± 1°C.

2.1.3 Perbenihan dan larutan pengencer

a. *Brilliant Green Lactose Bile Broth* 2% (BLGH)

b. *Buffered Peptone Water*

c. *Lauryl Sulphate Tryptone/Tryptose broth* (LST) atau Lactose Broth.

2.1.4 Cara kerja

2.1.4.1 Uji Sangkaan

a. Lakukabn homogenisasi contoh seperti padaA.6.
b. Pipet 1 ml pengenceran contoh $10^{-'}$ ke dalam masing-masing 3 tabung yang berisi 5 ml *Lauryl Sulphate Tryprose Broth* atau *Lactose broth* yang di dalamnya terdapat tabung Durham terbalik.
c. Lakukan juga dengan cara yang sama terhadap pengenceran $10^{-'}$ (1:100) pada 3 tabung kedua dan 10^{-3} (1:1000) pada 3 tabung ketiga (tiap pengenceran pergunakan pipet yang baru dan steril).
d. Simpan semua tabung dalam lemari pengeram *(incubator)* pada suhu 36 ± 1°C selama 24 dan 48 jam.
e. Setelah 24 jam kemudian catatjumlah tabung yang membentuk gas pada masingmasing pengenceran dan simpan lagi tabung yang tidak membentuk gas dalam inkubator pada suhu 36 ± 1°C selama 24 jam, kemudian catatjumlah tabung yang membentuk gas.

2.1.4.2 Uji Penegasan *(confirmed test)*

a. Pindahkan sebanyak 1 sengkelit dari tiap tabung yang membentuk gas pada media LST ke dalam tabung yang berisi 10 ml *Brilliant Green Lactose Bile broth 2%* (BGLB 2%).
b. Masukkan semua tabung ke dalam lemari pengeram (inkubator) pada suhu 36 ± 1 °C selama 24-48 jam.
Adanya gas pada tabung BGLB memperkuat adanya bakteri coliform dalam contoh. c. Catatjumlah tabung yang positif gas pada uji penegasan.

d. Angka Paling Mungkin dari coliform dilihat pada Tabel 2.

Tabel II
Daftar APM coliform (menggunakan 3 tabung)

Kombinasi/Jumlah tabung yang positif			APM per gram/ atau ml
1 : 10	1 : 100	1 : 1000	
0	0	0	< 3
0	0	1	3
0	1	0	3
1	0	0	4
1	0	1	7
1	1	0	7
1	1	1	11
1	2	0	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
2	2	1	28
3	0	0	23
3	0	1	39
3	0	2	64
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1 100
3	3	3	>2 400

2.2 MetodaAPM (Angka Paling Mungkin) menggunakan 5 tabung : Untuk contoh air, air minum dalam kemasan dan susu.

2.2.1 Prinsip

Sama seperti pada butir 2. 1.1

2.2.2 Peralatan

Sama seperti pada butir 2.1.2., dengan tambahan pipet ukur 10 ml.

2.2.3 Perbenihan

- *Lauryl Sulphate Tryptose (LS7) broth* atau *Lactose broth (single dan double strength). - Brilliant Green Lactose File broth 2%.*

2.2.4 Cara kerja

Pipet masing-masing 10 ml cuplikan ke dalam 5 tabung yang berisi 10 ml *Lactose broth* atau *Lauryl Sulphate Tryptose broth double strength,* yang di dalamnya terdapat tabung Durham terbalik.
Pipet masing-masing 1 ml dan 0,1 ml cuplikan ke dalam 5 tabung yang kedua dan ketiga yang berisi 5 ml perbenihan yang sama tetapi yang single strength. Selanjutnya kerjakan seperti pada butir 2.1.4.1 dimulai dari butir d dan 2.1.4.2 dimulai dari butir a sampai dengan c.
Hitung APM coliform per 100 ml contoh dengan menggunakan Tabel III.

Tabel III
Daftar APM coliform menggunakan 5 tabung

Kombinasi/ jumlah tabung yang positif	APM/ 100 ml	Kombinasi/ jumlah yang positif	APM/ 100 ml
0–0–0	< 2	4–2–0	22
0–0–1	2	4–2–1	26
0–1–0	2	4–3–0	27
0–2–0	4	4–3–1	33
		4–4–0	34
1–0–0	2	5–0–0	23
1–0–1	4	5–0–1	30
1–1–0	4	5–0–2	40
1–1–1	6	5–1–0	30
1–2–0	6	5–1–1	50
		5–1–2	60
2–0–0	4	5–2–0	50
2–0–1	7	5–2–1	70
2–1–0	7	5–2–2	90
2–1–1	9	5–3–0	80
2–2–0	9	5–3–1	110
2–3–0	12	5–3–2	140
3–0–0	8	5–3–3	170
3–0–1	11	5–4–0	130
3–1–0	11	5–4–1	170
3–1–1	14	5–4–2	220
3–2–0	14	5–4–3	280
3–2–1	17	5–4–4	350
4–0–0	13	5–5–0	240
4–0–1	17	5–5–1	300
4–1–0	17	5–5–2	500
4–1–1	21	5–5–3	900
4–1–2	26	5–5–4	1600
		5–5–5	1600 [illegible]

Catatan : Bila contoh dipipet kedalam tabung sebanyak 1 ml, 0,1 ml dan 0,01 ml, makaAPM coliform per 100 ml dihitung dengan rumus :

$$APM/100ml = \frac{APM\ dalam\ daftar \times 10}{ml\ terbesar\ dipipet}\ jumlah$$

Contoh : Kombinasi/jumlah tabung yang positif adalah 5-2-1 dan jumlah terbesar dipipet 1 ml APM dalam daftar (5-2-1) = 70

Maka APM coliform/100 ml = $\frac{70 \quad 10}{1}$ = 700

2.3 Metoda "Plate Count" (Angka lempeng)

2.3.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri coliform setelah contoh diinkubasikan dalam perbenihan yang cocok selama 24-48 jam pada suhu 36 ± 1°C.

2.3.2 Peralatan

a. Cawan petri (90 - 100 mm) b. Pipet ukur 1 ml c. Inkubator 36 ± 1°C. d. Penangas air 45 ± 1°C.

2.3.3 Perbenihan

Violet Reb Bile

Agar.

2.3.4 Cara kerja

a. Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada A.6.
b. Pipet 1 ml dari masing-masing pengenceran dan masukkan ke dalam cawan petri steril.
c. Tuangkan *Violet Red Bile Agar* (VRBA) yang telah dicairkan pada suhu 45 ± 1°C sebanyak 10-15 ml.
d. Goyangkan cawan petri dengan posisi terbalik pada suhu 36 ± 1°C selama 24 jam. e. Inkubasikan cawan petri dengan posisi terbalik pada suhu 36 ± 1°C selama 24 jam. f. Hitung koloni yang berwarna merah gelap yang berukuran diameter 0,5 mm atau lebih yang dinyatakan sebagai bakteri coliform yang terbentuk dalam cawan. g. Hasil dinyatakan sebagai berikut :
Jumlah bakteri coliform per gram/mililiter contoh dihitung dengan mengalikan jumlah koloni coliform dalam cawan dengan faktor pengenceran yang digunakan.

3. Escherichia Coli

3.1 Metoda APM (Angka Paling Mungkin) 3.1.1
Prinsip

Pertumbuhan E.Coli yang ditandai oleh terbentuknya gas di dalam tabung Durham setelah diinkubasikan dalam perbenihan yang cocok pada suhu 44°C selama 24-48 jam, yang diikuti dengan uji biokimia dan selanjutnya dirujuk pada tabel APM.

3.1.2 Peralatan

a. Alat homogenisasi (blender) b.
Penangas air 44 - 45°C c. Inkubator
36 + 1°C d. Pipet ukur 1 ml, 10 ml e.
Sengkelit (ose) f. Labu erlenmeyer
g. Tabung reaksi (150 x 15 mm) h.
Tabung Durham (75 x 10 mm) i. Cawan
petri

j. Mikroskop

k. Gelas sediaan

3.1.3 Perbenihan dan pereaksi

- Escherichia Coli Broth (EC Broth) Brilliant Green Lactose Bile (BGLB) Broth 2% Mac Conkey Broth

  Eosin Methylene Blue (EMB) Agar
- Violet Red - Bile Agar (VRBA) Methyl Red - Voges Proskauer (MR - VP) Medium Trypton Broth
  Simmons Citrate Agar atau Koser Citrat
  Nutrient Agar (Agar-agar) Pereaksi Kovacs

  Larutan Methyl Red
  Pereaksi Voges Proskauer Pereaksi
  untuk pewarna Gram

- Pereaksi Indole
- Larutan alfa-naftol Larutan kalium hidroksida 40% Koser's Citrat medium.

3.1.4 Cara kerja

a. Masukkan 1 sengkelit (1 loopful) biakan yang positif gas pada LST Broth dari pengujian angka paling mungkin bakteri coliform ke dalam tabung berisi E.C. Broth yang di dalamnya terdapat tabung Durham terbalik.

b. Inkubasikan dalam penangas air pada suhu 44-45°C selama 24-48 jam.
c. Catat tabung yang di dalamnya terbentuk gas *(E.coli* dianggap positif, jika di dalam tabung terbentuk gas).
d. Lanjutkan penetapan *E.coli* dengan menginokulasikan biakan yang membentuk gas ke perbenihan EMB atau VRBA dalam cawan petri. e. Inkubasikan pada suhu 35° selama 18-24 jam.
f. Pilih koloni berwarna gelap (VRBA) yang berdiameter 0,5 mm atau lebih, atau koloni berwarna kilap logam (EMB) dan inokulasikan pada *Nutrient Agar* miring dalam tabung, inkubasikan pada suhu 35°C selama 18 - 24 jam, dan pada waktu yang sama lakukan pewarnaan Gram sebagai berikut : Buat sediaan di atas kaca alas. Keringkan di udara dan fiksasikan dengan panas. Warnai sediaan dengan larutan crystal violet - *ammonium oxalate* selama 1 menit. Cuci dengan airdan tiriskan. Bubuhkan larutan *Lugol* (Gram's *iodine)* selama 1 menit. Cuci dengan air kran dan tiriskan. Cuci (hilangkan warna) dengan alkohol 95% selama 30 detik. Cuci dengan air kran, tiriskan dan bubuhkan *Hucker's counterstain* (larutan safranin) selama 10-30 detik. Cuci dengan air kran, tiriskan, serap dengan kertas saring, keringkan dan periksa dibawah mikroskop.
g. Lakukan pengujian IMViC (Indol, merah metil, *Voges-Proskauerdan* sitrat) dari biakan Nutrient Agar pada butir f.

3.1.4.1 Pengujian IMViC

a. Uji indol

Dari biakan murni *nutrient agar* miring, inokulasikan 1 sengkelit biakan ke dalam *tryptone broth.* Inkubasikan pada suhu 35 ± 1^0C, selama 18-24 jam. Tambahkan 0,2-0,3 ml pereaksi indol ke dalam masing-masing tabung dan kocok selama 10 menit. Warna merah tua pada permukaan menunjukkan reaksi indole positif. Warna jingga menunjukkan reaksi indole negatif.

b. Uji Merah Metil *(methyl red)*

Dari biakan murni *nutrient* agar miring, inokulasikan 1 sengkelit biakan ke dalam perbenihan MR-VP.
Inkubasikan pada suhu 35°C selama 48 jam. Dengan menggunakan pipet, pindahkan 5 ml ke dalam tabung reaksi, tambahkan 5 tetes merah metil dan kocok. Warna kuning menunjukkan reaksi negatif, dan warna merah menunjukkan reaksi positif.

c. Uji *VP (Voges Proskauer)*

Dari biakan murni *nutrient* agar miring inokulasikan 1 sengkelit biakan ke dalam perbenihan MR-VP. Inkubasikan pada suhu 36 ± 1°C selama 48 jam.
Dengan menggunakan pipet, pindahkan 1 ml suspensi ke dalam tabung, tambahkan 0,6 ml larutan alfa *naftol* dan 0,2 ml larutan kalium hidroksida dan kocok. Diamkan selama 2-4 jam. Warna merah muda hingga merah tua menunjukkan reaksi positif, warna tidak berubah menunjukkan reaksi negatif.

d. Uji Sitrat

Dari biakan murni nutrient agar miring inokulasikan 1 sengkelit biakan ke dalam perbenihan *Simmons Citrate* atau Koser's *citrat.* Inkubasikan pada suhu 35°C selama 48-96 jam. Warna biru menunjukkan reaksi positif, warna hijau menunjuk

kan reaksi negatif (pada perbenihan Simons sitrat) dan adanya kekeruhan pada perbenihan Koser's citrat menunjukkan reaksi positif.

3.1.4.2 Hasil dinyatakan sebagai berikut

a. Amati terbentuk tidaknya gas dalam tabung Durham. Jika terbentuk gas, dengan menunjukkan ke Tabel Angka Paling Mungkin (Tabel II), dapat dinyatakan Angka Paling Mungkin (APM) *E.coli.*

b. Tegaskan hasil uji pewarnaan Gram dan reaksi biokimia. Jika pewarnaan Gram menunjukkan adanya bakteri berbentuk batang dan warna merah muda (gram negatif) serta reaksi biokimia menunjukkan uji indol dan merah metil positif, dan uji VP serta uji sitrat negatif, dapat dinyatakan penegasan adanya *E. coli.*

c. Hitung APM *E.coli* per gram atau mililiter contoh dengan menggunakan Tabel II.

Sifat-sifat bakteri Coliform dengan uji IMViC

Indole	Methyl Red	Voges Proskauer	Citrat	Type
+	+	-	-	*Typical E. coli*
-	+	-	-	*Atypical E. coli*
+	+	-	+	*Typical Intermediate*
-	+	-	+	*Atypical Intermediate*
-	-	+	+	*Typical E. aerogenes*
+	-	+	+	*Atypical E. aerogenes*

Yang termasuk E.coli ialah Typical E.coli (++- -) dan Atypical E.coli (-+- -) **3.2**

Metode penyaringan (membrane filter)

Untuk contoh air minum dan air minum dalam kemasan (air yang telah diproses). **3.2.1**

Prinsip

Pertumbuhan bakteri *E.coli* pada membran penyaring setelah diinkubasi pada 44-45°C dalam media yang sesuai yang dilanjutkan dengan uji penegasan.

3.2.2 Peralatan

Sama seperti pada 3.1.3

3.2.3 Perbenihan dan pereaksi

a. M-FC medium atau M-FC agar

b. Perbenihan dan pereaksi IMViC (3.1.4)

3.2.4 Cara kerja

3.2.4.1 Isolasi *E.col i*

a. Pasang peralatan penyaringan (*filtration unifl* clan kerjakan seperti pada butir 1.2.4. b. Saring sebanyak 100 ml cuplikan (contoh) melalui membran penyaring yang diletakkan pada alat penyaringan.

c. Angkat secara aseptik membran penyaring dengan menggunakan pinset (*forcep*) steril.

d. Letakkan membran penyaring di atas bantalan (*pad*) yang telah dijenuhkan dengan 2 ml perbenihan M-FC broth atau di atas perbenihan M-FC agar dalam cawan petri.

e. Inkubasikan cawan petri dalam penangas air (setelah dimasukkan dalam kantong plastik yang anti air) atau dalam lemari pengeram pada suhu 44-45°C selama 24 jam.

f. Hitung koloni *E.coli* (yang terbentuk pada membran penyaring) yang berwarna biru; bakteri bukan *E.coli* berwarna abu-abu sampai krim.

3.2.4.2 Uji penegasan

Lakukan uji penegasan *E.coli* dengan uji IMViC seperti diuraikan pada 3.1.4.1 dari koloni yang terbentuk pada membran penyaring.

3.2.4.3 Perhitungan

Hitung jumlah *E.coli* dalam contoh setelah uji penegasan dengan rumus :

$$\text{E.coli / 100 ml} = \frac{\text{koloni pada membran x 100}}{\text{100 ml contoh yang diperiksa/disaring}}$$

4. Salmonella 4.1

Prinsip

Pertumbuhan Salmonella pada perbenihan selektif yang dilanjutkan dengan uji biokimia clan Uji serologi.

4.2 Peralatan

a. Botol pengencer 500 ml
b. Tabung reaksi (18 mm x 180 mm) c.
Gelas ukur 100 ml
d. Pipet ukur 1 ml clan 10 ml
e. Cawan petri ~ 90-100 mm clan ~ 140 - 150 mm f.
Gelas sediaan
g. Inkubator (lemari pengeram) suhu 37°C clan 42-43°C

h. Pengering kabinet
i. Penangas air
j. Pengaduk gelas
k. Sengkelit (ose)
I. Alat sterilisasi filter *(Seitz filteratau Millipore Membrane Filter).*

4.3 Perbenihan dan pereaksi

a. Bismuth Sulfite Agar (BAS) *b.*
Brilliant Green Agar (BGA)
c. Buffered Peptone Water(BPW) d.
Pereaksi Galaktosidase
e. Pereaksi indol dan perbenihan indol
f. Lysine Decarboxylation Medium (LDC) g.
NutrientAgar
h. Saline Solution
i. Selenite Crystine Broth
j. Semi-Solid NutrientAgar
k. Tetrathionate Brilliant Green Broth l.
Triple Sugar Iron Agar (TSI Agar) *m.*
Urea Agar atau Urea broth n. MR-VP
Medium o. Salmonella polyvalent o
p. Salmonella polyvalent H (Antisera Spicer Edwards) q.
XLD *(Xylose Lysine Desoxxycholate* Agar) r. SSA
(Salmonella Shigella Agar) s. HE agar *(Hektoen*
EntericAgar).

4.4 Cara kerja

4.4.1 Penyiapan dan homogenisasi contoh

Lakukan homogenisasi contoh seperti diuraikan pada A.7

4.4.2 Pra-Pengkayaan (pre-enrichment)

a. Pindahkan contoh yang telah dihomogenisasi (4.4.1) secara aseptik ke dalam botol 500 ml steril.
b. Inkubasikan pada 36 ± 1°C selama 16-20 jam.

4.4.3 Pengkayaan *(enrichment)*

a. Pipet 10 ml biakan pra-pengkayaan (4.4.2) ke dalam 100 ml *Seletine Cystine Broth.* b. Inkubasikan pada suhu 35 - 37°C selama 24 jam.
c. Pipet 10 ml biakan pra-pengkayaan (4.5.2) ke dalam 100 ml *Tertrathionate Brilliant Green Broth.*
d. Inkubasikan pada suhu 43°C selama 24 jam.

4.4.4 Penanaman pada perbenihan pilihan/selektif

a. Pindahkan biakan pengkayaan (4.4.3) dengan cara menggoreskan masing-masing biakan dengan sengkelit ke dalam cawan petri yang berisi BGA clan BSA atau perbenihan selektif lainnya (XLD, HE agar, SSAgar). b.
Inkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.
c. Amati tersangka koloni Salmonella pada media dengan ciri-ciri sebagai berikut : BGA : koloni yang berwarna merah muda hingga merah atau bening hingga buram dengan lingkaran merah muda sampai merah.
BSA : Koloni berwarna coklat, abu-abu sampai hitam clan kadang-kadang kilap logam. Warna media di sekitar koloni mula-mula coklat clan kemudian menjadi hitam jika masa inkubasi bertambah. Pada beberapa "strain" koloni berwarna hijau dengan daerah di sekelilingnya berwarna lebih gelap.
XLD : Koloni berwarna merah muda dengan bintik hitam ditengah
HE: Koloni berwarna biru-hjiau dengan atau tanpa bintik hitam ditengah. SSA : Koloni tak berwarna sampai merah muda, bening sampai buram.

4.4.5 "Confirmation" atau penegasan (uji biokimia)

a. Pilih 2-5 koloni tersangka clan goreskan pada permukaan nutrient agar dalam cawan petri yang sudah disiapkan terlebih dahulu clan inkubasikan pada suhu 37°C selama 20-24 jam.
b. Dari koloni yang diisolasi pada NutrientAgar, pindahkan ke dalam media sebagai berikut :

4.4.5.1 TSI Agar

a. Tersangka koloni Salmonella dipindahkan ke perbenihan miring TSIA dengan cara menggores bagian miringnya clan menusuk bagian tegaknya. b.
Inkubasikan pada suhu 37°C, selama 24-48 jam. c. Amati terjadinya perubahan-perubahan sebagai berikut :

Pada bagian tegaknya Salmonella akan :

- memfermentasikan glukosa, warna media berubah dari ungu menjadi kuning.
- tidak memfermentasikan skarosa media tetap ungu.
- dapat membentuk gas H_ZS, warna media berubah dari ungu menjadi hitam.

Pada bagian miringnya Salmonella akan :

- dapat memfermentasikan laktosa atau sakarosa warna media menjadi kuning.
- tidak dapat memfermentasikan laktosa atau sakarosa, warna media tetap merah atau tidak berubah.

4.4.5.2 Urea Agar

a. Goreskan tersangka koloni Salmonella pada permukaan Urea Agar miring.
b. Inkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Timbulnya warna merah muda menunjukkan reaksi positif clan warna tidak berubah reaksi negatif.

4.4.5.3 Lysine Decaboxylation Medium

a. Inokulasikan tersangka koloni Salmonella pada perbenihan cair (Lysine Decar-boxylase Broth).

b. Inkubasikan pada suhu 37°C selama 48 jam. Timbulnya warna ungu menunjukkan reaksi positif.

4.4.5.4 Beta-Galactosidase reagent

a. Suspensikan tersangka koloni Salmonella dalam 0,25 ml larutan saline dalam tabung reaksi.
b. Tambahkan 1 tetes toluena.
c. Masukkan dalam penangas air pada suhu 37°C selama beberapa menit.
d. Tambahkan 0,25 ml pereaksi.Betagalactosidase clan kocok.
e. Simpan lagi dalam penangas air pada suhu 37°C selama 24 jam. Terbentuknya warna kuning menunjukkan reaksi positif clan bila tidak berubah reaksi negatif.

4.4.5.5 V.P. Medium

a. Masukkan masing-masing 1 sengkelit tersangka koloni Salmonella ke dalam 2 tabung reaksi yang masing-masing berisi 0,2 ml perbenihan VP.
b. Inkubasikan tabung ke-1 pada suhu kamar clan tabung ke-2 suhu 37°C selama 48 jam.
c. Kemudian pada tiap tabung tambahkan 2 tetes larutan creatine, 3 tetes larutan alphanaftol clan 2 tetes pereaksi KOH. Lakukan pengocokan tiap kali menambahkan pereaksi.
d. Amati dalam waktu 15 menit. Terbentuknya warna merah jambu sampai merah tua menunjukkan reaksi positif clan bila tidak berubah reaksi negatif.

4.4.5.6 Indol medium

a. Masukkan 1 sengkelit tersangka Salmonella ke dalam media indol dalam tabung. b. Inkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Tambahkan 1 ml pereaksi indol.
c. Terbentuknya warna gelang merah menunjukkan reaksi positif clan bila tidak berubah atau warna kuning kecoklatan reaksi negatif.

Reaksi biokimia dari Salmonella

a. TSI Agar
bagian tegaknya : warna kuning dengan atau tanpa warna hitam (H_2S).
bagian miringnya : Warna merah atau tidak berubah
b. Urea Agar: Warna tidak berubah (reaksi negatif) c.
Lysine decarboxylase : Warna ungu (reaksi positif)
d. Beta-Galactosidase : Warna tidak berubah (reaksi negatif) e. Uji
Voges-Proskauer : Warna tidak berubah (reaksi negatif) f. Uji indol
: Warna kuning kecoklatan (reaksi negatif)

4.4.6 Uji Serologi

Lakukan uji serologi bila reaksi biokimia menunjukkan ada Salmonella. Ambil 1 sengkelit biakan dari TSI Agar clan oleskan pada gelas sediaan. Kemudian teteskan sedikit antisera di samping biakan. Dengan menggunakan sengkelit campur tetesan antisera dengan kultur hingga homogen. Penggumpalan yang terjadi menunjukkan uji positif.

Jika reaksi biokimia menunjukkan adanya Salmonella dan uji serologi positif, maka Salmonella dinyatakan positif.

5. Staphylococcus Aureus

5.1 Metoda *"Plate Count"* (Angka Lempeng)

Untuk contoh yang diperkirakan mengandung lebih dari 100 *Staphylococcus aureus* per gram

5.1.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada perbenihan khusus setelah diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24-48 jam dan dilanjutkan dengan uji koagulase.

5.1.2 Peralatan

a. "Spreader" dari gelas (batang kaca yang dibengkokkan seperti huruf L, panjang 20 cm, bagian yang bengkok 3 cm dan garis tengah kaca 3,5 mm). b. Tabung reaksi (10 x 75 mm)
c. Cawan petri ~ 100 mm
d. Pipet ukur 1 ml
e. Lemari pengeram 36 ± 1°C
f. Penangas air 45 ± 1°C
g. "Laminarflowcabinet" atau lemari pengeram untuk mengeringkan permukaan perbenihan pada cawan petri.

5.1.3 Perbenihan dan pereaksi

a. Baird-ParkerAgar
b. Brain Heart Infusion Broth (BHIB) c.
Plasma kelinci

5.1.4 Cara kerja

a. Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada A.6.
b. Pipet0,1 ml suspensi dari setiap pengenceran ke atas permukaan Baird Parker Agar dan sebarkan merata dengan menggunakan "Spreader". Keringkan permukaan agar sebelum diinkubasi.
c. Inkubasikan pada suhu 36 ± 1°C selama 30-48 jam.
d. Pilih cawan petri yang mengandung koloni 20-200 dan hitung tersangka koloni Staphylcoccus aureus yaitu koloni berwarna hitam mengkilat dengan lingkaran cerah di sekelilingnya.
e. Lanjutkan pemeriksaan dengan uji koagulase.

5.1.4.1 Uji Koagulase

a. Pindahkan koloni tersangka ke dalam tabung berisi 5 ml *Brain Heart Infusion Broth.*
b. Inkubasikan pada suhu 36 ± 1°C selama 20-24 jam.

c. Siapkan dalam tabung steril plasma darah kelinci sebanyak 0,3 ml clan tambahkan 0,1 ml biakan dalam BHIB yang berumur 1 malam.
d. Inkubasikan campuran plasma kelinci dengan biakan BHIB pada 36 ± 1°C selama 2-6 jam.
e. Amati ada tidaknya koagulasi. Bila tidak terjadi koagulasi lanjutkan inkubasi pada suhu kamar selama 24 jam, clan amati kembali ada tidakanua koagulasi.
f. Hitungjumlah Staphylococcus aureus dalam 1 gram atau 1 ml contoh yang memberikan reaksi koagulase positif (jumlah koloni dalam cawan dikalikan faktor pengenceran).

5.2 Metoda APM (Angka Paling Mungkin)

Untuk contoh yang diperkirakan mengandung kurang dari 100 Staphylococcus aureus per gram.

5.2.1 Prinsip

Pertumbuhan Staphylococcus aureus dalam perbenihan cair yang cocok setelah diinkubasikan pada suhu 36 ± 1°C selama 48 ± 2 jam, yang dilanjutkan dengan uji penegasan clan selanjutnya dirujuk pada Tabel APM.

5.2.2 Peralatan

Sama seperti pada 5.1.2

5.2.3 Perbenihan dan pereaksi

a. Sama seperti pada 5.1.3
b. Trypticase (tryptic) Soy Broth yang mengandung 10% NaCl

5.2.4 Cara kerja

a. Lakukan persiapan clan homogenisasi contoh seperti pada A.6.
b. Pipet masing-masing 1 ml pengenceran ke dalam 3 tabung (3 seri) yang berisi Trypticase soy broth yang mengandung 10% NaCl
c. Inkubasikan tabung pada 36 ± 1°C selama 48 ± 2 jam.
d. Pindahkan 1 sengkelit *(loopfun* biakan dalam setiap tabung yang memperlihatkan adanya kekeruhan keatas perbenihan Baird-ParkerAgar dalam cawan petri dengan cara menggoreskannya supaya diperoleh koloni yang terpisah.
e. Inkubasikan cawan petri sekurang-kurangnya 30 jam pada suhu 36 ± 1°C.
f. Pindahkan cawan petri sekurang-kurangnya 1 koloni dari setiap cawan ke dalam perbenihan *Brain Heart Infusion Broth* clan selanjutnya lakukan uji penegasan (uji koagulase) seperti pada 5.1.4.
g. Hitung jumlah Staphylococcus aureus dalam contoh dengan merujuk/menggunakan tabel I I (seperti pada 2.1)
Hasil dinyatakan dalam APM Staphylococcus aureus per gram (APM/gram).

6. Enterococci

6.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri Streptococci (Enterococci) pada perbenihan yang cocok (K.F. Streptococcus Medium, atau Packer's Crystal-Violet Azide Blood Agar) sebagai uji dugaan, yang dilanjutkan dengan uji penegasan.

6.2 Peralatan

a. Cawan petri (100 x 15 mm) atau 90 x 15 mm) b.
Pipet ukur 1 ml
c. Penangas air 45 ± 1°C d.
Alat penghitung koloni e.
Sengkelit (Ose)
f. Inkubator (lemari pengeram) 36 ± 1°C f.
Mikroskop

6.3 Perbenihan dan pereaksi

a. Packer's Crystal Violet Azid Blood Agar (PCVBA) atau *b.*
K.F Streptococcus Agar c. Brain Heart Infusion Broth d. Brain
Heart Infusion Broth 6,5% NaCl e. Hidrogen peroksida 3%
f. Pereaksi pewarnaan Gram *g.*
Tryptose Bile Broth 40% h.
Tryptose Broth pH 7.2.

6.4 Cara kerja

a. Lakukan homogenisasi contoh seperti pada A.6.
b. Pipet 1 ml dari setiap pengenceran ke dalam cawan petri.
c. Tuangkan 15 ml PCVABA atau KF yang telah terlebih dahulu dicairkan dan didinginkan sehingga suhu 45 ± 1°C.
d. Campurkan sehingga benar-benar homogen dan suspensi tersebar merata.
e. Setelah perbenihan membeku, inkubasikan pada suhu 36 ± 1°C selama 72 jam untuk Packer's atau 48 jam untuk KF.
f. Pilih cawan petri yang mengandung sejumlah 25-250 koloni tersangka *Streptococcus.*
g. Hitung jumlah dugaan fecal *Streptococcus* per gram atau ml contoh.

Keterangan :
Ciri-ciri koloni tersangka Streptococci, adalah sebagai berikut :
Pada perbenihan Packer's , koloni kecil berwarna ungu dan pada perbenihan KF berwarna merah tua yang menyatakan adanya S. Feacalis dan berwarna merah muda pucat yang menyatakan adanya S. *faecium.*

6.4.1 Uji penegasan Enterococci

a. Pilih 5-10 koloni tersangka, kemudian inokulasikan masing-masing koloni ke dalam *Brain* Heart *Infusion Broth* dalam tabung dan inkubasikan pada suhu 36 ± 1°C selama 18-24 jam, atau sampai timbul kekeruhan.
b. Lakukan pewarnaan gram dari biakan (a) seperti pada 3.1.4.f. dan amati adanya Gram positif cocci, berpasangan atau berantai pendek.
c. Ambil 3 ml biakan (a), campurkan di dalam tabung dengan 0,5 ml hidrogen peroksida 3%. Tidak adanya pembentukan gelembung-gelembung udara (menyatakan kalatase negatif) dan menguatkan bahwa biakan adalah *Streptococcus.*
d. Inokulasikan biakan *Streptococcus* tersebut ke dalam tabung berisi *Brain Heart Infusion Broth.* Masukkan ke dalam penangas air 45 ± 1°C dan inkubasikan pada suhu tersebut selama 48 jam dan perhatikan adanya pertumbuhan bakteri.
e. Masukkan biakan *Streptococcus* ke dalam tabung *Brain* Heart *Infusion Broth* 6,5% NaCl inkubasikan pada suhu 36 ±1°C selama 72 jam. perhatikan adanya pertumbuhan.
f. Inokulasikan *Streptococcus* kedalam perbenihan *Tryptose Broth* pH 7,2. Panaskan pada suhu 60°C selama 30 menit dalam penangas air. Dinginkan dan inkubasikan pada 36 ± 1°C selama 48 jam. Perhatikan adanya pertumbuhan.
g. Inokulasikan biakan *Streptococcus* kedalam perbenihan Tryptose. Bile Broth 40%, inkubasikan pada 36 ± 1°C selama 48 jam. Perhatikan adanya pertumbuhan yang ditandai dengan adanya kekeruhan.

6.4.1.1 Hasil uji penegasan Enterococci

a. Tumbuh pada perbenihan yang mengandung 40% "bile" (empedu) b. Tumbuh pada suhu 45 ± 1°C
c. Tumbuh dalam perbenihan yang mengandung 6.5% NaCl. d. Tahan pada pemanasan suhu 60°C selama 30 menit. e. Memperlihatkan reaksi katalase negatif.
f. Bersifat gram positif, berbentuk cocci yang oval, berpasangan atau rantai pendek.

7. Clostridium PerFringens 7.1

Prinsip

Pertumbuhan *Clostridium perfringens* yang dapat mereduksi sulfit pada media selektif yang dicirikan oleh terbentuknya koloni berwarna hitam dan yang dilanjutkan dengan uji penegasan.

7.2 Peralatan

a. Cawan petri
b. Tabung kimia
c. *Anaerobicjar(sungkup* anaerob) d. Inkubator air 45 + 1°C e. Penangas air 45 ± 1°C
f. Alat hitung koloni *(colony counter)* g. Mikroskop

7.3 Perbenihan dan pereaksi

a. *Cooked Meat Enrichment Medium b. Fluid Thioglycollate Medium c. Motility Nitrat Medium d. Peptone Water 0,1 %*
e. *Sporalation broth*
f. *Sulphite Polymyxin Sulphadiazin Agar (SPS* Agar) g. Pereaksi pewarnaan Gram

7.4 Cara kerja

a. Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada A.6.
b. Pipet 1,0 ml dari setiap pengenceran contoh tersebut pada cawan petri secara duplo. c. Tuangkan sebanyak 15-20 ml *Sulphite Polymyxin Sulphadiazin Agar yang* telah dicairkan.
d. Campurkan perbenihan dan contoh hingga serba sama dan biarkan hingga membeku. e. Masukkan cawan-cawan petri dengan posisi terbalik dalam anaerobicjar suasana anaerob.
f. Inkubasikan anaerobic jar pada 36 ± 1°C selama 24 jam.
g. Pilih cawan petri yang mengandung 25-250 koloni yang berwarna hitam dan hitung jumlah koloni *Clostridia* per gram contoh.

7.4.1 Uji penegasan Clostridium perfringens

a. Pilih 10 koloni tersangka dari cawan SPS dan inokulasikan masing-masing koloni ke dalam *Fluid thioglycolate broth* yang baru dihilangkan udaranya dan telah dingin. b. Inkubasikan pada 36 ± 1°C selama 18-24 jam.
c. Periksa tiap perbenihan dengan pewarnaan Gram seperti pada 3.1.4.f. dan amati adanya bakteri berbentuk batang tebal dengan ujung yang kasar dan bersifat Gram positif (warna ungu).
d. Inokulasikan setiap perbenihan pada tabung-tabung yang berisi *Motility Nitrate Medium, Sporalation broth* dan *Cooked Meat Medium* dan inkubasikan pada 36 ± 1 °C selama 24 jam.
e. Periksa tipe pertumbuhan bakteri pada motility medium *(Clostridium perfringens* tidak bergerak/non motile) dan reduksi nitrat dengan menambahkan 0,5-1,0 ml larutan alfa-naftilamin dan sejumlah yang sama asam sulfanilat *(Clostridium perfringens* mereduksi nitrat, yang dicirikan dengan terbentuknya warna merah muda atau sindur dalam 15 menit).
f. Lakukan pewarnaan spora pada biakan Sporalation broth sebagai berikut :
Buat sediaan dari sedimen dari biakan pada *Sporalation broth,* di atas gelas sediaan, keringkan diudara dan fiksasikan dengan panas. Warnai dengan larutan zat warna hijau melasit 10% *(malachite green)* selama 10 menit Qika perlu panaskan 3-4 kali dalam waktu 30 detik, lalu dinginkan). Cuci dengan air dan warnai dengan larutan zatwarna safranin selama 15 detik, bilas/cuci dengan air, serap dengan kertas saring, keringkan dan periksa di bawah mikroskop. *(Clostridium perfringens* membentuk spora yang berwarna hijau dan sel vegetatif berwarna merah).
g. Hitung jumlah *Clostridium perfringens* setelah uji penegasan berdasarkan persentase (jumlah %") dari koloni yang betul-betul *Clostridium perfringens.*

7.4.2 Contoh perhitungan

Jumlah koloni yang berwarna hitam pada pengenceran 10^{-4} adalah 85 dan 8 dari 10 koloni yang diuji tegas adalah *Clostridium perfringens.* Makajumlah *Clostridium perfringens* per gram contoh adalah :

85 x 8/10 x 10.000 = 680.000 atau 6,8 x 10^{5}

8. Vibrio Cholerae

8.1 Prinsip

Pertumbuhan *Vibrio cholerae* dalam perbenihan TCBS, dilanjutkan uji biokimia dan uji serologi.

8.2 Peralatan

Alat homogenisasi (blender atau stomacher)
Inkubator 36 ± 1°C dan 22 ± 1°C Penangas air
45 ± 1 °C Sengkelit (Ose)
Cawan petri (100 x 15 mm)
Gelas sediaan tetes gantung
Mikroskop
Lemari pendingin 4 ± 1°C
Pipet ukur 1 ml
Tabung reaksi 150 x 15 mm
Cakram *polymyxin B.*

8.3 Perlengkapan lain

a. Washed sheep red blood cells. b.
Washed chicken red blood cells. c.
Phage 1 V
d. Sera anti Ogawa dan Inaba untuk *Vibrio cholerae* e.
Antisera polyvalent 0 untuk *Vibrio cholerae*

8.4 Perbenihan

a. Thiosulfate Citrate Bile SaltAgar(TCBSA)
b. Aronson'sAgar
c. Taurocholate Trypticase Tellurite Gelatine Agar (TTTGA) d.
GelatineAgar
e. TSI Agar
f. Motility Indole (MI) agar
g. NutrientAgar
h. Pepton SugarBroth (1% gula), masing-masing tabung berisi glukosa, sakarosa, arabinosa, mannosa, manitol dan inositol.
i. Decarboxilase test media terdiri dari *L-lysin 1 %, L-arginin, L-ornithin* dalam basal medium

j. Hugh - Leifson medium
k. Tetrtamethyl paraphenylene diamine dihydrochloride. l. Heart Infusion Broth
m. Mueller Hinton Agar
n. Buffered Glucose Broth

8.5 Larutan pengencer

Alkaline Peptone Water atau Peptone Dilution Fluid 3% NaCl.

8.6 Pereaksi

a. Vibriostatic
b. Mineral oil
c. Saline solution
d. Pereaksi
e. Formalinized Mercuric Iodide Saline Solution

8.7 Cara kerja

8.7.1 Isolasi Vibrio cholerae

a. Lakukan homogenisasi contoh dengan cara seperti A.6. dengan menggunakan larutan pengencerAlkaline *Pepton Water.* Inkubasikan pada suhu 36 ± 1°C selama 6 jam. Pindahkan 1 sengkelit suspensi, inokulasikan ke TCBS Agar dan perbenihan yang tidak selektif seperti *NutrientAgar, Aronson's* dan TTTGA. Inkubasikan pada suhu 36 ± 1°C selama 18-24 jam.
b. Inokulasikan 1 sengkelit dari biakan *Alkaline Peptone Wateryang* berumur6 jam ke dalam tabung yang berisi 10 ml *Alkaline Pepton Wateryang* masih baru, inkubasikan tabung selama 6 jam. Pindahkan 1 sengkelit suspensi di atas TCBS agar, *Nutrient Agar, Aronson's* agaratau TTTGA, inkubasikan pada suhu 36 ± 1°C selama 18-24 jam.
c. Lakukan uji motility pada kaca alas tetes gantung dengan menggunakan biakan *Alkaline Peptone Wateryang* berumur6jam. Selanjutnya inkubasikan biakan *Alkalin Pepton* Waterpada suhu 36 ± 1°C selama 18-24 jam. Inokulasikan ke tiap dua pernbenihan lempeng (TCBS agar, Nutrient Agar, *Aronson's Agar* atau TTTGA). Inkubasikan pada suhu 36 ±1°C selama 18-24 jam.
d. Inokulasi 3 atau lebih koloni tersangka ke atas *Nutrient Agar* miring (slant agar)

Keterangan :

Koloni tersangka *Vibrio cholerae* pada TCBS agarditandai dengan koloni besar (2-3 mm), halus, berwarna kuning, sedikit datar dengan bagian tengah keruh dan sekelilingnya translusen (bening). Di atas GelatineAgar, koloni transparant dan "zone berawan sekelilingnya" lebihjelas setelah beberapa menit dalam lemari pendingin.

Di atas *Aronson'sAgar,* koloni 2-3 mm, halus, translusen dan "agak cembung" dengan bagian tengah berwarna merah muda atau merah dan sekelilingnya tidak berwarna. Pada Nutrient Agar, koloni besartranslusen, warna ke abu-abuan.

8.7.2 Uji biokimia dan penegasan *Vibrio cholerae*

a. Inokulasikan koloni tersangka pada TSI Agar

Inkubasikan pada suhu 36 ± 1°C selama 18-24 jam. *Vibrio cholerae* diduga positif jika terlihatwarna kuning (terbentuk asam) di permukaan dan pada dasar tabung tanpa pembentukan gas dan H_2S.

b. Fermentasi Hugh Leifson Medium.

Inkubasikan koloni tersangka ke dalam 2 tabung *Hugh Leifson Medium* dengan cara menusuk sampai dasartabung. Tuangkan ke dalam salah satu tabung 1 ml parafin cair. Inkubasikan pada suhu 36 ±1°C selama 18-24 jam.

Fermentasi positifjika pada kedua tabung terbentukwarna kuning. Jika warna kuning hanya terbentuk pada bagian atas dari tabung tanpa parafin, dan tidak ada pertumbuhan pada tabung yang lain menunjukkan terjadi oksidasi.

c. Fermentasi karbohidrat.

Inokulasikan biakan dari *Nutrient Agar* yang berumur 24 jam ke dalam *Peptone SugarBroth,* (glukosa, sukrosa, arabinosa, mannosa, manitol dan inositol). Inkubasikan pada suhu 36 ± 1°C dan amati setiap hari selama 4-5 hari. Warna merah menunjukkan terbentuknya asam.

d. Uji decarboxilase

Inokulasikan biakan dari *Nutrient Agar* yang berumur 24 jam ke dalam 3 media asam amino dan kontrol. Tambahkan 10 ml lapisan mineral oil kedalam masing-masing tabung (termasuk kontrol) Inkubasikan pada suhu 36 ± 1°C amati setiap hari selama 4 hari. Reaksi positif jika terbentuk warna ungu. Reaksi negatif jika tetap berwarna kuning.

e. Uji String

Pilih sebuah koloni besardari biakan agar atau pertumbuhan pada agar miring, emulsikan dengan 1 tetes suspensi *Nadesoxycholate* 0,5% di atas gelas sediaan. Reaksi positif jika dalam waktu 10 detik terbentuk massa seperti lendir.

f. Uji Vibriostatic

Sematkan biakan berumur24 jam di atas permukaan NutrientAgar. Letakkan cakram kertas saring kering yang mengandung Vibriostatic agent 0/129. Inkubasikan pada suhu 36 ±1°C selama 24 jam. Reaksi positif jika ada pertumbuhan di sekeliling cakram, sedangkan *Vibrio cholerae* tidak tumbuh disekeliling cakram.

8.7.3 Membedakan El Tor dan Cholerae Biotype

a. Sheep Cell Hemolysis

Inokulasikan biakan dari NutrientAgar miring ke dalam tabung *Heart Infusion Broth.* Inkubasikan pada suhu 36 ± 1°C selama 18-24jam. Pindahkan 0,5 ml biakan ke dalam tabung yang berisi suspensi. *"Washed Sheep red blood cell" 10%* dalam larutan saline. Campur dan inkubasikan campuran tesebut pada suhu 36 $\underline{+1^0C}$ selama 2 jam. Dan diamkan pada suhu 4± 1°C selama 18-24 jam. Amati ada tidaknya hemolisa. Reaksi negatifjika tidakterjadi hemolisa, menunjukkan adanya Vibrio *cholerae biotipe cholerae.* Sedangkan El Tor biotype menunjukkan reaksi hemolisa.

b. *"Phage Susceptibility"*

Inokulasikan biakan dari *Heart Infusion Broth* berumur 4 jam di atas *MuellerHinton Agar.* Pindahkan 1 sengkelit larutan `phage IV' ke atas permukaan agar yang sudah diinokulasikan biakan. Inkubasikan pada suhu 36 ±1°C selama 15-24 jam. Reaksi positif jika tidak terjadi pertumbuhan. Biotipe El Tor tahan terhadap 'phage IV'.

c. *`Polymyxyn B Susceptibility'*

Inokulasikan biakan dari *Heart Infusion Broth* berumur 4 jam ke atas *MuellerHinton Agar,* biarkan mengering. Letakkan cakram polymyxyn P 50 mg di atas *Mueller HintonAgar.* Reaksi positifjika terjadi pertumbuhan. Biotipe El Tor tahan terhadap polymyxyn B.

d. Uji *Voges - Proskauer*

Inokulasikan biakan dari NutrientAgar miring berumur 24 jam ke dalam tabung berisi 1 ml *Buffered Glucose Broth.* Inkubasikan pada suhu 22 ± 1°C selama 48 jam. Pindahkan 1 ml, biakan ke dalam tabung reaksi, tambahkan 0,6 ml larutan naphthol dan 0,2 ml larutan KOH. Kocok, diamkan 2-6 jam. Reaksi positif jika warna merah muda berubah menjadi merah.

e. *Chicken Cell Agglutination*

Teteskan di atas gelas sediaan suspensi 2,5% washed *chicken red blood cells* dalam larutan saline, dan emulsikan koloni dari NutrientAgar miring dalam suspensi. Goyangkan gelas sediaan selama kira-kira 1 menit. Reaksi positif jika terjadi penggumpalan sel darah merah.

8.7.4 Uji serologi untuk *Vibrio cholerae*

Pindahkan koloni tersangka dari NutrientAgar, GelatineAgar, Aronson's agaratau TCBS Agar ke atas Nutrient Agar miring. Inkubasikan pada suhu 36 ± 1°C selama 4-18 jam. Cuci pertumbuhan koloni agar miring dengan menggunakan larutan *Formalinized Mercuri Iodide Saline* sehingga diperoleh suspensi. Dengan menggunakan pensil gelas tandai dua bagian kira-kira 1x2 cm diatas gelas sediaan letakkan sedikit suspensi di atas dua daerah yang ditandai. Tambahkan 1 tetes antisera polyvalent *Vibrio cholerae 0* pada salah satu suspensi, suspensi yang lain untuk kontrol. Uji positif jika terjadi penggumpalan. Lakukan uji serologi dengan menggunakan anti sera Ogawa dan Inaba. Uji positifjika terjadi penggumpalan.

8.7.5 Pernyataan hasil

Tabel 4
Reaksi biokimia *Vibrio cholerae*

Jenis pengujian	Reaksi
Gram	-
Aglutinasi dalam anti sero 0 atau X	+
Motility	+
Oksidasi	+
Glukosa (pembentukan asam)	+
Glukosa (pembentukan gas)	-
D-mannitol	+
L-inositol	-
Sukrosa	+
Mannosa	+
Arabinosa	-
L-Lysin decarboxylase	+
L-Arganin dihydrolisa	-
L-Ornithine decarboxylase	+
H_ZS pada TSI	-
Uji string	+
Haemolisa tabung	-
"Phage IV Susceptibility"	+
"Polymyxyn B Susceptibility"	+
Voges-Proskauer	-
Chicken Cel Aglutination	-

Jika reaksi biokimia menunjukkan adanya Vibrio cholerae dan uji serologi positif, maka Vibrio cholerae dinyatakan positif.

9. Kapang dan Khamir 9.1

Prinsip

Pertumbuhan kapang clan khamir dalam media yang cocok, setelah di inkubasikan pada suhu 25°C atau suhu kamar selama 5 hari.

9.2 Peralatan

a. Cawan petri (100 x 15 mm)
b. Pipet ukur 1 ml clan 10 ml c.
Penangas air 45 ± 1°C
d. Lemari pengeram 25°C atau suhu kamar e.
Alat penghitung koloni f. Mikroskop

9.3 Perbenihan dan pengencer

a. Peptone Dilution Fluid atau Peptone Water
b. PDA (Potato DextroseAgar) atau perbenihan, yang lainnnya (Mycophil, Malt Agar) yang ditambah dengan antibiotik chlorotetracycline atau chloramphenicol atau streptomycine (250 ml perbenihan ditambah dengan 1 ml larutan 1 gram antibiotik dalam 100 ml air suling steril).

9.4 Cara kerja

a. Lakukan persiapan clan homogenisasi contoh seperti A.6.
b. Pipet 1 ml dari masing-masing pengenceran ke dalam cawan petri secara simploduplo.
c. Tuangkan PDA yang telah dicairkan atau perbenihan lainnya (suhu 45 ± 1°C) sebanyak 15-20 ml ke dalam cawan petri clan goyangkan cawan petri sedemikian rupa sehingga campuran tersebar merata.
d. Setelah agar membeku, balikkan cawan petri clan inkubasikan pada suhu 25°C atau suhu kamar selama 5 hari.
e. Hitung koloni kapang clan khamir setelah 5 hari.
f. Laporkan/catat hasil sebagai jumlah kapang clan khamir per gram atau ml contoh.

Keterangan :
1) Koloni kapang biasanya buram clan berbulu
2) Koloni khamir berwarna putih clan licin (berbau asam)
3) Tegaskan koloni dengan pemeriksaan di bawah mikroskop sehingga yakin bahwa koloni tersebut adalah kapang clan atau khamir.

C. Pengencer, perbenihan (media) clan pereaksi

1. Pengencer

1.1 Alkaline Peptone Water (APW)

Pepton 10 gram Natrium klorida
10 gram Air suling 1 liter
Larutkan bahan-bahan dalam 1 liter air suling. Atur pH 8,4 - 8,6, masukkan 7 ml ke dalam tabung reaksi.
Sterilkan pada suhu 121°C selama 10 menit.

1.2 Buffered Peptone Water (BPW)

Peptone
Natrium klorida 10 gram 5
Disodium hydrogen phosphate gram 3,5
Kalium dihidrogen phophate Air gram 1,5
suling gram 1
liter

Larutkan bahan-bahan dalam 1 liter air suling, atur pH 7,0, masukkan 250 ml ke dalam botol (labu) 500 ml clan 9 ml ke dalam tabung reaksi. Sterilkan pada suhu 121°C selama 20 menit.

1.3 Peptone Water 1 %

Pepton	1 gram
Air suling	1 liter

Larutkan bahan dalam air suiling. Masukkan dalam botol (labu) atau tabung reaksi dalam jumlah tertentu. Sterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit.

1.4 Peptone Salt Dilution Fluid 3% NaCl

Peptone 10 gram Natrium klorida 30 gram Air suling 1
liter

Larutkan bahan dalam 1 liter air suling clan atur pH 7,0 ± 0,1. Sterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit.

1.5 Phosphate Buffered Dilution Water

a. Persediaan larutan Phosphate-Buffered

Larutkan 34 gram Kalium dihidrogen fosfat dalam 500 ml air suling. Atur pH 7,2 dengan NaOH 1 N (kira-kira diperlukan 175 ml) clan encerkan sampai 1 liter dengan air suling.

Sterilkan dalam autoklaf pada suhu 121^{0}C selama 15 menit dan simpan dalam lemari pendingin sampa saat akan digunakan. pH akhir setelah sterilisasi harus 7,0 ± 0, 1.

b. Buffered dilution water

Tambahkan 1,25 ml larutan Phosphate Buffered (a) ke dalam 1 liter air suling. Masukkan ke dalam botol atau tabung pereaksi dalam jumlah tertentu sehingga setelah sterilisasi isinya menjadi lebih kurang 2% dari jumlah yang diperlukan (dikehendaki). Sterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

2. Perbenihan

2.1 Aronson's Agar

A. Natrium karbonat (anhydrous), 10% w/v larutan dalam air	20 ml
B. Sakarosa, 20% w/v larutan dalam air	15 ml
C. Dekstrin, 20% w/v larutan dalam air	15 ml
D. Basic-fuchsin, 4% larutan dalam air	1 ml
E. Natrium sulfit (anhydrous), 10% w/v larutan dalam air	6,5 ml
NutrientAgar (2,35)	300 ml

Siapkan/buat larutan A,B,C dan E dalam air suling dan pertahankan suhu 100°C selama 30 menit. Tambahkan secara aseptik larutan A ke dalam Nutrient Agar cair dan uapi selama 30 menit. Kemudian tambahkan larutan lain (B, C, D dan E) secara aseptik dan uapi lagi selama 20 menit. Hingga terbentuk endapan, biarkan mengendap, dan tuangkan bagian yang jernihnya (supernatant) ke dalam cawan petri.

2.2 Baird parkerAgar

Tryptone	10 gram
Beef extract	5 gram
Yeast extract	1 gram
Litium chlorida, $6H_20$	5 gram
Agar	20 gram
Natrium Sulfametazin (sodium sulphametazine)	10 gram
Air suling	1 liter

Campurkan bahan-bahan dan panaskan sampai larut seluruhnya. Atur pH 6,8; masukkan dalam labu dan steril dalam autoklaf pada 121^{0}C selama 15 menit. Dinginkan sampai 50°C dan secara aseptik tambahkan emulsi eggyolk-tellurit. Campurkan dengan baik, kemudian tuangkan ke dalam pinggan petri kira-kira 15 ml.

Emulsi egg-yol tellurit :	
20% larutan glysine	6,3 ml
1% larutan kalium tellurit	1 ml
20% larutan natrium piruvat	5 ml
Emulsi egg-yolk	5 ml

2.3 Bismuth Sulphite Agar (BSA)

Pepton	10 gram
Beef extract	5 gram
Glucose/dextrose	5 gram
Disodium phosphate (anhydrous)	4 gram
Ferrous Sulphat	0,3 gram
Bismuth slphite, $Bi_3(SO_3)_3$	8 gram
Brilliant green	0,025 gram
Agar	20 gram
Air suling	1 liter

2.4 Brain Heart Infusion Broth

Infusi dari otak anak sapi (calf brains)	200 gram
Infusi dari Beef heart	250 gram
Pepton	10 gram
Natrium klorida	5 gram
Dinatrium hidrogen fosfat	2,5 gram
Glukosa	2 gram
Air suling	1 liter

Atur pH 7,4, masukkan 7 ml ke dalam tabung reaksi. Sterilkan pada 121°C selama 15 menit. **2.5**

Brain Heart Infusion Broth dengan 6,5% NaCl.

Buat seperti 2.4., tetapi dengan penambahan 65 gram Natrium klorida per liter. **2.6**

Brilliant Green Agar

Proteose peptone	10 gram
Yeast extract	3 gram
NaCl	5 gram
Lactose	10 gram
Sucrose	10 gram
Phenol red	0,08 gram
Brilliant green	0,0125 gram
Agar	20 gram
Air suling	1 liter

Larutkan bahan-bahan tersebut dalam 1 liter air suling sambil dididihkan 1 menit. Masukkan dalam labu, sumbat dengan kapas, kemudian sterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 5 menit dinginkan sampai 45 - 50°C lalu tuangkan ke dalam pinggan petri, dengan pH akhir 6,9 ± 1.

2.7 Brilliant Green Lactose Bile Broth 2%

Peptone	10 gram
Lactose	10 gram
Oxgall bile	20 gram
Brilliant green	0,0125 gram
Air suling	1 liter

Larutkan pepton dan laktosa dalam 400 ml air suling. Tambahkan 20 g oxgall yang dilarutkan dalam 200 ml air suling. Campurkan kedua larutan tersebut, lalu jadikan 950 ml atur pH 7,4. Tambahkan air suling hingga 1 liter, kemudian masukkan 10 ml ke dalam tabung kimia yang mengandung tabung Durham terbalik. Sterilkan dalam autoklaf pada 121°C selama 15 menit. Sesudah sterilisasi pH 7,2.

2.8 Buffered Glucose Broth

Proteose pepton 5 gram Glukose 5 gram Kalium monohidrogen fosfat 5 gram

Larutkan bahan-bahan dalam 1 liter air suling, panaskan hingga larut sempurna, masukkan 5 ml ke dalam tabung perbenihan dan sterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

2.9 Cooked Meat Enrichment Medium

Beef heart	454 gram
Proteose peptone	20 gram
Dextrose	2 gram
NaCl	5 gram
Air suling	1 liter

Atur pH 7,2, masukkan 10 ml ke dalam tabung atau Screw-capped bottles. Sterilkan pada 121°C selama 15 menit. pH akhir 7,2 ± 0,2.

2.10 Decarboxylase Basal Medium

Thiotone	5 gram
Beef extract	5 gram
Glukosa	0,5 gram
Bromocresol purple 1%	1 ml

Cresol red 0,2%	2,5 gram
Pyridoxal	0,005 gram
Air suling	1 liter

Masukkan bahan-bahan ke dalam 1 liter air suling. Campur dengan baik dan panaskan sampai larut. Sesuaikan pH 6,0 - 6,5. Sterilkan dalam autoklaf pada 121°C selama 15 menit.

2.11 Decarboxylase Test Media.

Thiotone	
Beef extract	**5 gram**
Glukosa	**5 gram** 0,5
Bromocresol purple 1 %	gram 1 ml
Cresol Red 0,2%	2,5 gram
Pyridoxal	0,005 gram
Air suling	1,0 ml

Masukkan bahan-bahan ke dalam 1 liter air suling. Campur dengan baik, dan panaskan supaya benar-benar larut, Sesuaikan pH 6,0 - 6,5. Perbenihan dasar ini dibagi menjadi 4 bagian yang sama.

Bagian pertama : Tidak ditambahkan asam amino dengan maksud untuk digunakan sebagai kontrol

Bagian kedua Tambahkan 1% L-Lysinedihydrokhloride.

Bagian ketiga Tambahkan 1% L-Arginine monohydrokhloride.

bagian keempat Tambahkan 1% L-Ornithine dihidrokhlorida. Untuk bagian yang berisi Ornithine, pH disesuaikan lagi sebelum dilakukan sterilisasi. Tuangkan tiap 3-4 ml dari masing-masing bagian ke dalam tabung kecil, lalu sterilkan pada suhu 121°C selama 10 menit. Sedikit endapan pada media Ornithine tidak akan mengganggu penggunaannya.

2.12 Egg-Yolk Emulsion

Pergunakan telur ayam yang masih segar, pisahkan kuning telur dari putih telur. Campurkan kuning telur dengan 4 kali jumlah air. Panaskan campuran dalam penangas air pada suhu 4046°C selama 2 jam dan biarkan sehingga endapan terbentuk selama 15-24 jam, tuangkan cairan jernih dan sterilkan dengan cara penyaringan. Simpan emulsi pada 0 - 5°C selama tidak lebih dari 72 jam sebelum dipergunakan.

2.13 Eosine Methylene Blue Agar (BMB Agar)

Peptone	10 gram
Lactose	10 gram
K_ZHP0_4	2 gram
Agar	15 gram
Air suling	1 gram
Eosine (larutan 2% w/v)	20 ml

Methylene blue (larutan 0,25% w/v) 25 ml
Masukkan bahan-bahan dalam 1 liter air suling, panaskan sampai larut. Sterilkan dalam autoklaf pada 121°C selama 15 menit. pH akhir 7, 1.

2.14 Escherichia Coli (EC) Broth.

Trypticase atau tryptone
Lactose
Bile salts No. 3
Dipotassium hydrogen phosphate
Potassium dihydrogen phophate
Natrium klorida
Air suling

20 gram 5
gram 1,5
gram 4
gram 1,5
gram 5
gram 1
gram

Larutkan bahan-bahan dalam 1 liter air suling. Jika perlu panaskan agar bahan-bahan benarbenar larut. Tuangkan tiap 10 ml ke dalam tabung yang berisi tabung Durham terbalik. Sterilkan pada 121°C selama 15 menit. pH akhir 6,9.

2.15 Fluid Thioglycollate Medium

Trypticase atau casitone
L-Cystine
Glukosa
Yeast extract Sodium
chlorida Sodium
thioglycollate Resazurin
0,1 % Agar
Air suling

15 gram 0,5
gram 5
gram 5
gram 2,5
gram 0,1
gram 1
gram 0,75
gram 1 liter

Masukkan bahan-bahan ke dalam 1 liter air suling dan didihkan supaya benar-benar larut. Dinginkan hingga 50-60°C dan tiap 10 atau 25 ml tuangkan ke dalam tabung-tabung. Sebelum penambahan media, masukkan 0,1 gram kalsium karbonat ke dalam tabung-tabung tadi. Sterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. pH akhir 7,1 ± 0,1.
Sebelum digunakan, tabung-tabung berisi media dipanaskan selama 10 menit dengan uap mengalir untuk menghilangkan O_Z yang larut, lalu segera dinginkan di bawah air kran.

2.16 Gelatine Agar

Gelatine 30 gram Natrium klorida 10 gram Trypticase/tryptone 10 gram Agar 15 gram Air suling 1 liter

Larutkan bahan-bahan dalam 1 liter air suling. Atur, pH akhir 7,2. Sterilkan pada 121 °C selama 15 menit.

2.17 Heart Infusion Broth

Infusi dari Beef heart	500 gram
Tryptose	10 gram
Natrium klorida	5 gram
Air suling	500 ml

Masukkan infusi dari beef heart ke dalam 500 ml air suling, kemudian tambahkan bahan-bahan yang lain lalu panaskan sehingga larut, Tuangkan ke dalam wadah dan sterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit. pH akhir 7,4.

2.18 Hektoen Enteric Agar

Proteose Pepton	
Yeast extract powder	12 gram
Lactose	3 gram 12
Sucrosa	gram 12
Galicin	gram 2 gram
Bile salt No. 3 Sodium	9 gram 5
chlorida Sodium	gram 5 gram
thiosulphate Ammonium	1,5 gram 0,1
ferric citrate Acid fuchsin	gram 0,065
Bromthymol blue Agar	gram 15
Air suling	gram 1 liter

Larutkan 76 gram media ini ke dalam 1 liter air suling dan aduk 10 menit. Atur pH 7,5 ± 1. Panaskan tidak lebih dari 1 menit hingga mendidih aduk sampai agarnya melarut. Jangan disterilkan dalam autoclave. Dinginkan sampai 60°C dan tuangkan ke dalam cawan petri sebanyak 20 ml. Jangan disimpan lebih dari 1 hari.

2.19 Hugh-Leifson Medium

Pepton	2 gram 5
Natrium khlorida	gram 0,3
Potassium monohydrogen phosphate	gram 10
Glucose	gram 1
Air suling	liter

Masukkan seluruh bahan-bahan ke dalam 985 ml air suling, panaskan sampai mendidih sehingga larut. Tuangkan tiap 5 ml ke dalam tabung kecil dan sterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit. pH akhir 7.1.

2.20 Indole Medium

Tryptone 10 gram NaCl 5 gram DL-tryptophane 1,0 gram
Air suling 1 liter

Larutkan bahan-bahan dalam air suling, larut pH 7,0. masukkan dalam tabung 0,16 mm sebanyak 5 ml. Sterilkan dalam autoklaf pada 121°C selama 15 menit.

2.21 K.F. Streptococcus Agar

Proteose Peptone	10 gram
Yeast extract	3 gram
Natrium khlorida	5 gram
Natrium Glycerophosphate	10 gram
Maltose	20 gram
Lactose	1 gram
Sodium azide	0,4 gram
Bromcresol purple	0,015 gram
Agar	15 gram
Air suling	1 liter

Masukkan bahan-bahan ke dalam 1 liter air suling. Tuangkan ke dalam labu-labu dengan ukuran yang diinginkan, lalu sterilkan pada suhu 121°C selama 10 menit.

Dinginkan hingga mencapai suhu 50-60°C dan tambahkan 1 ml larutan triphenyl tetrazolium chloride 1% yang sudah disterilkan secara filtrasi untuk tiap 100 ml perbenihan. Campur dengan baik dan dinginkan hingga suhu 45°C, lalu tuangkan ke dalam cawan petri.

2.22 Koser's Citrate Broth

Sodium amonium hidrogen phosphate
K_Z H $P0_4$
MgSO
Sodium citrate
Air suling

1,4 gram 1
gram 0,2
gram 3
gram 1
liter

Larutkan bahan-bahan dan atur pH 6,8. Masukkan ke dalam tabung sebanyak 10 ml. Sterilkan selama 15 menit pada 121°C.

2.23 Lactose Broth (single strength)

Beef extract 3 gram Peptone 5 gram Lactose 5 gram
Air suling 1 liter

Larutkan bahan-bahan, atur pH 6,8. Masukkan sebanyak 10 ml ke dalam tabung kimia yang berisi tabung Durham terbalik. Sterilkan selama 15 menit pada suhu 121°C.

2.24 Lactose Broth (double strength)

Beef extract 6 gram Peptone 10 gram Lactose 10 gram Air suling 1 liter

Larutkan bahan-bahan, atur pH 6,8. Masukkan ke dalam tabung sebanyak 20 ml. Sterilkan selama 15 menit pada suhu 121°C.

2.25 Lauryl Sulphate Broth (single strength)

Tryptone, tryptose atau trypticase	20 gram
Lactose	5 gram
KZHP04	2,75 gram
KHZP04	2,75 gram
NaCI	5 gram
Sodium lauryl sulphate	0,1 gram
Air suling	1 liter

Larutkan bahan-bahan dalam air suling, atur pH 6,8. Masukkan 10 ml ke dalam tabung kimia yang mengandung tabung Durham terbalik. Sterilkan selama 10 menit pada 121°C.

2.26 Lauryl Sulfate Tryptose Broth (double strength)

Tryptone, tryptose atau trypticase 40 gram Lactose 10 gram KZHP04 5,5 gram KHZP04 5,5 gram NaCI 10 gram Sodium lauryl sulphate 0,2 gram Air suling 1 liter

Larutkan bahan-bahan dalam air suling, atur pH 6,8. Masukkan 10 ml ke dalam tabung kimia yang mengandung tabung Durham terbalik. Kemudian sterilkan selama 10 menit pada 121°C.

2.27 Lysine Decarboxylase Broth

L-lysine 5 gram Peptone 5 gram Yeast extract 3 gram Glukosa 1 gram Bromcresol purple (larutan 1%) 0,015 gram

Air suling 1 liter

Masukkan bahan-bahan ke dalam 1 liter air suling. Panaskan perlahan-lahan sambil diaduk agar larut, Masukkan 5 ml ke dalam tabung. Sterilkan pada suhu 121°C selama 20 menit. pH akhir 6,5.

2.28 Mac Conkey Agar

Peptone	20 gram
Lactose	10 gram
Bile salts	1,5 gram
NaCl	5 gram
Agar	15 gram
Neutral red	0,03 gram
Crystal violet	0,001 gram
Air suling	1 liter

Larutkan semua bahan-bahan, atur pH 7,8. Sterilkan selama 15 menit pada 121°C. Tuangkan ke dalam pinggan petri sebanyak 15 ml.

2.29 Mac.Conkey Broth

Pepton	
Lactosa	
Bile salts	20 gram
Natrium klorida	10 gram 5
Merah netral (larutan 1 %)	gram 5
atau ungu Bromcresol (larutan 1 %)	gram 7,5
Air suling	ml
	1 liter

Larutkan bahan-bahan dalam air suling. Tuangkan tiap 10 ml ke dalam tabung berisi tabung Durham terbalik. Sterilkan selama 10 menit pada 121°C pH akhir 7,6.

2.30 M-FC Broth

Tryptose 10 gram

Proteose peptone No. 3 atau polypeptone 5 gram

Yeast extract 3 gram

Sodium chloride 5 gram

Lactose 12,5 gram

Bile salt No. 3 or bile

Salt mixture 1,5 gram Aniline blue 0,1 gram Distilled water 1000 ml

Rehidrasikan dalam air suling yang mengandung 10 ml asam rosolat (rosolic acid) 1% dalam NaOH 0,2 N. panaskan hingga mendidih, dengan cepat angkat dari panas dan dinginkan sampai di bawah 45°C. Jangan disteril diautoklaf. pH akhir harus 7,4. Media harus disimpan pada suhu 2- 10°C dan setiap sisa media harus dibuang setelah 96 jam.

2.31 M-FC Agar

Seperti pada pembuatan M-FC broth (2.30) hanya ditambah dengan Agar-agar sebanyak 20 gram.

2.32 MR-VP Medium

Peptone 7 gram Glucose 5 gram NaCl	30 gram
K_ZHP0_4	5 gram
Air suling	1 liter

Larutkan bahan-bahan, atur pH 6,9. Masukkan ke dalam tabung kimia sebanyak 20 ml. Sterilkan selama 15 menit pada 121°C.

2.33 Motility-Nitrate Medium

Beef extract	
Peptone	3 gram
Potassium nitrate	5 gram
Agar	1 gram
Air suling	3 gram
	1 liter

2.34 Mueller-Hinton Agar

Infusi dari sapi (Beef, infusion from)	300 gram
Asam Casamino	17,5 gram
Starch	1,5 gram 17
Agar	gram 1 liter
Air suling	

Masukkan infusi ke dalam 1 liter air suling, tambahkan bahan yang lain, panaskan hingga mendidih sambil diaduk supaya benar-benar larut. Sterilkan pada suhu 115°C selama 15 menit. pH akhir 7,3 ± 0, 1.

2.35 Nutrient Agar

Beef extract 3 gram Peptone 5 gram Agar 15 gram

Air suling 1 liter

Larutkan bahan-bahan, atur pH 6,8 - 7,0. Masukkan ke dalam labu, sterilkan pada suhu 121 °C selama 15 menit.

2.36 Parker's Crystal-Violet Azide Blood Agar

Tryptone 15 gram Beef extract 3 gram Sodium chloride
5 gram Agar 30 gram Air suling 1 liter

Masukkan bahan-bahan ke dalam 1 liter air suling. Atur pH 7,2. Masukkan dalam labu sebanyak 100 ml. Sterilkan pada suhu 115°C selama 15 menit. Dinginkan hingga 50°C dan ke dalam setiap 100 ml tambahkan 5 ml darah domba yang dihilangkan fibrinnya *(defibrinated sheep blood) 0,4* ml larutan 0,05% crystal violet dalam air yang disterilkan dalam autoklaf, dan 1 ml larutan natrium azida 5% dalam air yang disterilkan dengan cara penyaringan. Aduk/campurkan betul-betul dan tuangkan ke dalam cawan petri.

2.37 Peptone Sugar Broth (11% Gula)

Pepton	10 gram
Natrium klorida	5 gram
Air suling	1 gram

Masukkan bahan-bahan ke dalam 1 liter air suling. Tambahkan 10 ml indikator Andrade *(Andrade's indicator)* Atur pH 7,15. Tuangkan ke dalam labu. Tambahkan 1% gula yang diperlukan untuk dasar. Larutkan dan masukkan ke dalam tabung yang berisi Durham terbalik. Sterilkan pada suhu 115°C selama 10 menit.

1% gula masing-masing : Glukosa, Sakarosa., Manosa, Menitol dan Inositol.

2.38 Plate count Agar (PCA)

Yeast extract	
Pancreatic digest of Caseine	2,5 gram
Glucose	5 gram 1
Agar	gram 15-20
Air suling	gram 1 liter

Larutkan semua bahan-bahan, atur pH 7,0. Masukkan dalam labu, sterilkan pada 121 °C selama 15 menit.

2.39 Potato Dextrose Agar (PDA) + Asam

Infusion from White Potatoes 200 gram Dextrose 20
gram Agar 15 gram Air suling 1 liter

Larutkan semua bahan. Masukkan dalam labu, sterilkan pada 121°C selama 15 menit. Sebelum dipergunakan dinginkan sampai 50°C dan pH diatur 3,5 dengan asam tartrat 10% steril. Campurkan, kemudian tuangkan ke dalam pinggan petri.

2.40 Potato Dextrose Agar + Antibiotik

Infusion from White Potatoes 200 gram Dextrose 20
gram Agar 15 gram Air suling 1 liter

Pembuatan sama dengan (2.39) hanya ditambah antibiotik (lihat B.9.3.b). **2.41**

S.S. Agar.

Beef extract	5 gram
Pepton	5 gram
Lactose	10 gram
Bile salt No. 3	8,5 gram
Sodium citrate	10 gram
Sodium thiosulphate	8,5 gram
Ferric citrate	1 gram
Brilliant green	0,0033 gram
Netral red	0,025 gram
Agar	15 gram

Campurkan 63 gram media dalam 1 liter air suling dan panaskan hingga mendidih, tambahkan agar dan aduk sampai melarut. Jangan disterilkan dalam autoclave. Dinginkan pada 50°C kocok dan tuangkan ke dalam cawan petri.

2.42 Selenite Cystine Broth

Tryptone	5 gram
Lactose	4 gram
Na_2HPO_4	8 gram
Sodium selenite	4 gram
L-Cystine	0,01 gram
Air suling	1 liter

Larutkan bahan-bahan dalam air suling, panaskan 10 menit. pH akhir 7,0 - 7,2. Jangan disteril di autoklaf. Media ini tidak steril harus langsung dipergunakan atau disimpan dalam lemari es selama 24 jam.

2.43 Cimons Citrate Agar

Magnesium sulfat	0,2 gram
Ammonium hidrogen phosphate	1 gram
Potasium monohydrogen phosphate	1 gram
Sodium citrate dihydrate	2 gram
Sodium clorida	5 gram
Bromthymol blue 0,2%	40 ml
Agar	15 gram
Air suling	1 liter

pH dijadikan 7,5 ± 1.

Larutkan bahan-bahan dalam air suling sampai mendidih. Masukkan dalam tabung kimia sebanyak 10 ml. Sterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. pH akhir6,8- 7,0. Tabung dimiringkan di atas rak hingga bagian yang tegak (butt) mempunyai ukuran 2,5 cm.

2.44 Sporulation Broth

Trypticase 20 gram Vitamine-free casamino acid 20 gram Sodium thiglycollate 1 gram Distilled water 1 liter

Masukkan tiap 10 ml ke dalam tabung bertutup. Sterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit. Sebelum dipergunakan tiap tabung ditambah 1 ml thiamine hydrocloride (10 gram/ml) yang telah disterilkan dengan cara penyaringan.

2.45 Sulphite Polymyxin Sulphadiazine Agar

Tryptone 15 gram Yeast extract 10 gram Ferric citrate 0,5 gram Agar 15 gram Air suling 1 liter

Atur pH 7,0, sterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit, lalu tambahkan 5 ml larutan Nasulfit 10% dalam air, dan 10 ml larutan 1,2% Na-sulfadiazin dalam air (semuanya disterilkan dengan penyaringan). Campurkan hingga homogen, lalu tuangkan dalam cawan petri.

2.46 Taurocholate Trypticase Tellurite Gelatine

Agar (TTTGA)
Tryptone 10 gram Natrium klorida 10 gram Natrium
taurocholate 5 gram Gelatin 1 gram Agar 15 gram Air
suling 1 liter

Larutkan bahan-bahan dengan memanaskan dalam 1 liter air suling. Atur pH 7,0. Tuangkan ke dalam botol-botol atau labu, sterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit. Sebelum digunakan tambahkan 0,5 - 1 ml larutan Potassium tellurite 1%(yang sudah disterilkan secara filtrasi) ke dalam setiap 100 ml perbenihan cair dan suhu 50-60°C. Campurkan dengan baik, dan perbenihan siap untuk digunakan.

2.47 Tetrathionate Brilliant Green Broth

Tryptose atau Proteose 5 gram Bile salts 1 gram
Calcium carbonate 10 gram Sodium thiosulfate 30 gram
Air suling 1 liter

Campurkan bahan-bahan dalam 1 liter air suling, aduk sampai melarut. Simpan di tempat yang dingin, jika perlu pada suhu 5-8°C. Bila media akan dipergunakan tambahkan 2 ml larutan 0,5% Brilliant Green steril, didihkan dengan hati-hati selama 10 menit, dan tambahkan 20 ml larutan Iodine yang dibuat seperti di bawah ini. Aduk sampai tidak terjadi pengendapan. Media tidak boleh dipanaskan sesudah penambahan larutan Iodine.

Larutan Iodine : larutkan 5 gram Kalium Yodida dan 6 gram kristal Yod dalam 20 ml air steril dalam labu steril. Larutkan lagi dengan air steril 20 ml dan larutan disimpan dalam tempat yang gelap.

2.48 Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrosa (TCBS) Agar

Yeast extract 5 gram Pepton 10 gram Sukrosa 20 gram
Sodium citrate dihydrate 10 gram Sodium thiosulphate
pentahydrate 8,5 gram Ox-gall 1 gram Natrium klorida 10
gram Ferric citrate 1 gram Biru Bromthymol (larutan
02%) 20 ml

Agar	15 gram
Air suling	1 liter

Masukkan bahan-bahan ke dalam 1 liter air suling, panaskan sampai mendidih sambil aduk sampai larut. Dinginkan pada 45-50°C. Tuangkan tiap 15-20 ml ke dalam cawan petri. pH akhir 8,6.

2.49 Triple Sugar Iron Agar (TSIA)

Meat extract
Yeast extract
Peptone NaCl
Lactose
Sucrose
Glucose
Ferric citrate
Sodium thio sulphate
Phenol red Agar
Air suling

3 gram
3 gram 20
gram 5 gram
10 gram 10
gram 1 gram
0,3 gram 0,3
gram 0,024
gram 12
gram 1 liter

Larutkan bahan-bahan dan atur pH 7,4. Masukkan ke dalam tabung sebanyak 10 ml. Sterilkan selama 10 menit pada 121°C. Biarkan membeku dalam posisi miring.

2.50 Trypticase Soy Broth 10% NaCl

Trypticase
Phytone peptone
Potassium monohydrogen phosphate
Glukosa
Natrium klorida
Air suling

15 gram 5
gram 2,5
gram 2,5
gram 100
gram 1
liter

Masukkan bahan-bahan ke dalam 1 liter air suling dan larutkan. Tuangkan tiap 7 - 10 ml dalam tabung dan sterilkan selama 15 menit pada 121°C. pH akhir 7,3.

2.51 Tryptone Broth

Larutkan 10 gram tryptone ke dalam 1 liter air suling, tuangkan tiap 5 ml ke dalam tabung. Sterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit.

2.52 Tryptose Broth

Tryptose	10 gram
Glucose	1 gram

Sodium chloride	5 gram
Thiamine hydrochloride	0,005 gram
Air suling	1 liter

Atur pH 7,2. Masukkan dalam tabung sebanyak 5 ml. Sterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit.

2.53 Tryptose Bile Broth 40%.

Tryptose	10 gram
Glucose	1 gram
Sodium chloride	5 gram
Thiamine hydrochloride	0,005 gram
Ox-gall	40 gram
Air suling	1 liter

Atur pH 6,9 - 7,0. Masukkan dalam tabung sebanyak 5 ml. Sterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit.

2.54 Tryptose Salt Broth (6,5% NaCl)

Seperti pada pembuatan Tryptose broth (2.52) hanya dengan penambahan 65 gram NaCl per liter. Ph diatur 6,9 - 7,0.

2.55 Urea Agar

a. Peptone 1 gram Glucose 1 gram NaCl 5 gram

KH_ZP0_4	2 gram
Phenol red	0,012 gram
Agar	15 gram
Air suling	1 liter

Larutkan bahan-bahan dalam 1 liter air suling. Sterilkan selama 20 menit pada 121 °C.

b. Urea	400 gram
Air suling	1 liter

Larutkan urea, sterilkan dengan penyaringan. Secara aseptik campurkan 50 ml larutan b) ke dalam 950 ml larutan a). Atur pH 6,8. Masukkan ke dalam tabung 10 ml dan biarkan beku dalam posisi miring.

2.56 Urea broth

Urea broth sama seperti 2.55, tetapi tanpa penambahan agar.

2.57 Violet Red Bile Agar

Yeast extract	3 gram
Pepton	7 gram
Sukrosa	20 gram
Sodium chloride	5 gram
Bile salts No. 3	1,5 gram
Lactose	10 gram
Netral red	0,03 gram
Crystal violet	0,002 gram
Agar	15 gram
Air suling	1 liter

Masukkan bahan-bahan ke dalam 1 liter air suling, panaskan sampai mendidih hingga semua bahan melarut. Sterilkan pada suhu 121°C. selama 15 menit. pH akhir7,4.

2.58 Xylose Lysine Desoxycholate Agar (XLD-Agar)

Yeast extract	3 gram
L-lysine HC1	5 gram
Xylose	3,75 gram
Sukrosa	7,5 gram 5
Sodium chloride	gram 0,08
Phenol red Agar	gram 15
Air suling	gram 1 liter

Larutkan bahan-bahan dalam 1 liter air suling, sterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit, dinginkan sampai suhu 50°C dan tambahkan : 20 ml larutan tiosulfat-sitrat (34 gram Natrium tiosulfat + 4 gram feriamonium sitrat + 100 ml air suling, yang disterilkan dengan cara penyaringan) dan 25 ml larutan 10% natrium disoksikolat (Sodium disoxychalate) dalam air yang disterilkan dengan cara penyaringan. Atur pH 6,9, lau tuangkan ke dalam cawan petri steril.

3. Pereaksi

3.1 Formalinized Mercuric Iodide Saline Solution

a. Larutan persediaan *(stock solution)* Mercuric

iodide	1 gram
Kalium yodida	4 gram
Air suling	100 ml

b. Larutan kerja *(Working solution)*

Larutan persediaan	10 ml
Larutan saline (0,5 atau 0,85% NaCl)	90 ml
Formalin	0,05 ml

3.2 Galaktosidase

a.

Natrium dihidrogen fosfat	6,9 gram
Larutan NaOH 0,1 N (4 g/1)	3,0 ml
Air suling untuk membuat sampai	50 ml

Larutkan Natrium dihidrogen fosfat dalam 45 ml air. Atur pH 7,0 ± 1. Tambahkan air hingga mencapai 50 ml. Simpan dalam lemari pendingin.

b.

Orto-nitrophenyl Beta-D-glacto Pyranoside	80 mg
Air suling	15 ml.

Larutkan pada 50°C, dinginkan, tambahkan 5 ml larutan a dan simpan pada 4°C tapi jangan lebih dari 1 bulan.

3.3 Gram

a. Larutan Crystal Violet

Crystal violet (85-90% kadar zat warna)	2 gram
Etil alkohol (95%)	20 ml
Amonium oksalat	0,8 gram
Air suling	80 ml.

Larutkan crystal violet dalam alkohol dan amonium oksalat dalam air suling. Campurkan kedua larutan tersebut dan simpan campuran selama 24 jam sebelum digunakan.

b. Larutan Lugol.

Iodine 1 gram Kalium yodida (KI) 2 gram Air suling 300 ml

Masukkan bahan-bahan ke dalam air suling, campurkan, dan biarkan 24 jam sehingga yod melarut sempurna.

c. Counterstain

Safranin	2,5 gram
Etil alkohol	10 ml
Air suling	100 ml

Larutkan safranin dalam alkohol dan campurkan dengan 100 ml air suling. **3.4**

Hidrogen peroksida (H_2O_2) 3%. 3.5 Indol (Kovac's reagent)

P-dimethylaminobenzaldehyde	5 gram
n-Amylalcohol	75 gram
HCI, pekat	25 ml

Larutkan P-dimethylaminobenzaldehyde dalam amilalkohol. Dengan perlahan-lahan tambahkan HCI. Simpan pada 4°C.

3.6 Merah metil (Methyl Red)

Methyl red	0,10 gram
Etil alkohol	200 ml

Larutkan methyl red dalam alkohol, lalu encerkan dengan air suling sampai menjadi 500 ml. **3.7**

Mineral oil

Sterilkan dalam oven (lemari pengering) ada suhu ± 180°C selama 6 jam atau dalam autoklaf suhu 121°C selama 30 menit.

3.8 Alfa-Naftol 1 %

larutkan 1 gram alfa-naftol dalam 100 ml alkohol mutlak. **3.9**

Rabbit Plasma (Plasma kelinci)

Gunakan Bacto-coagulase Plasma (EDTA (No. kode 0803) dehidrat. Larutkan 1 amful (100 mg) dalam 3 ml air suling steril. Larutan plasma yang tidak terpakai dapat disimpan dalam lemari pendingin (0-5°C) selama beberapa hari.

3.10 Saline solution

Natrium klorida (NaCl)	85, gram
Air suling	1 liter

Larutkan NaCl dalam air suling, atur pH 7,0. Sterilkan pada suhu 121°C selama 20 menit. **3.11**

Sera-anti polivalent H (tersedia dalam perdagangan) 3.12 Sera-anti polivalent 0 (tersedia

dalam perdagangan)

3.13 Spora (Schaeffer-Fulton)

Larutan A.

Malachite green	10 gram
Air suling	100 ml

Larutkan hijau malasit dalam air suling, saring untuk memisahkan bagian yang tidak larut.

Larutan B.

Safranin 0	0,25 gram
Air suling	100 ml

Larutkan safranin 0 dalam air suling

3.14 Tetra methyl-paraphenylene-diamine-dihydrochloride

Larutkan 1 gram tetra methyl-paraphenylene-diamine-dihydrochloride dalam 100 ml air suling. Jika perlu panaskan supaya benar-benar larut.
Pereaksi ini stabil selama 2 minggu jika dijauhkan dari cahaya, disimpan dalam botol berwarna diruang dingin. Jangan dipakai lagi jika warna berubah menjadi ungu tua.

3.15 Vibriostatic agent 0/129

2,4-Diamino-6,7-diiso-prophyl pteridine phosphate, tersedia di dalam perdagangan. Penggunaan sesuai dengan keterangan pada wadah.

3.16 V.P. (Voges Proskauer)

Pustaka

1. American Public Health Association: "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater". 17th ed. Washington. D.C. 1989.

2. Anonymous: "Laporan Sidang Pleno IX"; Panitia Kodeks Makanan Indonesia. Departemen Kesehatan RI., DitJen POM. Proyek Peningkatan Keamanan Makanan Pusat Jilid I. 1982/ 1983.

3. "Bacteriological Analytical Manual for Food". 6th ed. Food and Drug Administration, U.S.A. 1984.

4. Elliot, R.P; D.S. Clark; K.H. Lewis; H. Lundbeck; J.C Olson and B. Simonsen: "Microorganisms in Foods I. Their Significance and Methods of Enumeration". 2nd ed. ICMSF, University of Toronto Press, 1978.

5. Marth, E.H (Ed): "Standard Methods forThe Examination of Dairy Products" 14th ed. APHA, Washington, D.C, 1978.

6. Rifai, M.K.: "Manual of Food Quality Control. 4. Microbiological Analysis" F.A.O, Rome, 1979.

7. Speck, M. L, (Ed). "Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods" 2nd ed., APHA, Washington, D.C. 1984.

8. "The Oxoid Manual of Culture Media, Ingredients and Other Laboratory Services" 4th ed. Oxoid Ltd., Basingstoke, England., 1980.